

2017 (1)

Uniwersytet Jagielloński
Instytut Nauk o Środowisku

WARSZTATY METODOLOGICZNE
DLA DOKTORANTÓW:
BIOLOGIA EWOLUCYJNA

NEJCZER.

Kwiecień 2017 | Łazy k. Bochni.

SPIS TREŚCI

I. Prowadzący, recenzenci, uczestnicy	- 2
II. Tematy zaproponowane przez uczestników	- 3
III. Tematy wybrane i ich pierwotne tytuły	- 3
IV. Projekty, raporty oraz recenzje	- 4
1. „ŚPIĄCA KRÓLEWNA” VS „PORTRET DORIANA GRAYA” - WPŁYW MODELU STARZENIA SIĘ NA TEMPO EWOLUCJI I DOSTOSOWANIE U ORGANIZMÓW KRYPTOBIOTYCZNYCH	
1.1 Pierwsza wersja projektu	- 4
1.2 Recenzje	- 11
1.3 Końcowa wersja projektu	- 17
2. MIKROBIOME AS A DRIVING FACTOR OF FEEDING PREFERENCES	
2.1 Pierwsza wersja projektu	- 25
2.2 Recenzje	- 30
2.3 Końcowa wersja projektu	- 36
3. CIEMNE PODNIEBIENIE U SZCZENIĄT I DOROSŁYCH OSOBNIKÓW DUŻYCH RAS PSÓW DOMOWYCH (CANIS FAMILIARIS L.) JAKO WSKAŹNIK WYSOKIEGO POZIOMU AGRESYWNOSCI I INTELIGENCJI – PRAWDA, CZY MIT?	
3.1 Pierwsza wersja projektu	- 43
3.2 Recenzje	- 49
3.3 Końcowa wersja projektu	- 54
4. CZYNNIKI WPŁYWAJĄCĘ NA OCENĘ WŁASNEJ MASY CIAŁA ORAZ POSTRZEGANIE MASY CIAŁA U INNYCH KOBIET	
4.1 Pierwsza wersja projektu	- 61
4.2 Recenzje	- 66
4.3 Końcowa wersja projektu	- 73

PROWADZĄCY:

dr hab. Joanna Rutkowska, Instytut Nauk o Środowisku UJ

RECENZENCI:

prof. dr hab. Mariusz Cichoń, Instytut Nauk o Środowisku UJ

prof. dr hab. Ryszard Korona, Instytut Nauk o Środowisku UJ

UCZESTNICY:

Ewa Bobulska, Instytut Nauk o Środowisku UJ

Anna Gądek, Instytut Nauk Geologicznych UJ

Agnieszka Janas, Instytut Botaniki UJ

Krzysztof Miler, Instytut Nauk o Środowisku UJ

Monika Prus, Instytut Nauk o Środowisku UJ

Daniel Stec, Instytut Zoologii i Badań Biomedycznych UJ

Hanna Tutaj, Instytut Nauk o Środowisku UJ

Paulina Wietrzyk, Instytut Botaniki UJ

Katarzyna Woch, Instytut Nauk o Środowisku UJ

Kamila Zając, Instytut Nauk o Środowisku UJ

Martyna Żurawiecka, Instytut Zoologii i Badań Biomedycznych UJ

Magdalena Żywicka, Instytut Zoologii i Badań Biomedycznych UJ

OPRACOWANIE, SKŁAD I GRAFIKA:

Magdalena Żywicka, Instytut Zoologii i Badań Biomedycznych UJ

TEMATY ZAPROPONOWANE PRZEZ UCZESTNIKÓW:

1. Dynamika specjacji przy rozerwanych zasięgach (Kamila Zajęc)
2. „Śpięca Królowna” kontra „Portret Doriana Greya” - porównanie modeli starzenia się organizmów kryptobiotycznych (Daniel Stec)
3. Wpływ ekspozycji na THC w okresie prenatalnym na zdolności kognitywne myszy (Ewa Bobulska)
4. Efekt założyciela a tempo specjacji na przykładzie barberyjki marokańskiej (Katarzyna Woch)
5. Wpływ diety wysokobiałkowej i wysokotłuszczowej w okresie prenatalnym na procesy zapamiętywania u myszy (Martyna Żurawiecka)
6. Czy skład mikrobiomu przewodu pokarmowego wpływa na preferencje pokarmowe? (Hanna Tutaj)
7. Socjalność a furazowanie u pszczoł (Krzysztof Miler)
8. Fenotyp orientacji seksualnej (Magdalena Żywicka)
9. Czy bociany to monogamiści? (Paulina Wietrzyk)
10. Ciemne podniebienie u szczeniąt *Canis familiaris* wskaźnikiem agresywności u dorosłych osobników – prawda czy mit? (Anna Gądek)
11. Wpływ odczynu podłoża na poziom słodyczy winorośli (Agnieszka Janas)
12. Wpływ antropogenicznych zanieczyszczeń wód lądowych na żerowanie samic komara (Monika Prus)
13. Czy Banat należy do Karpat? (Kamila Zajęc)
14. Czy bioróżnorodność bezkręgowców zależy silniej od szerokości geograficznej czy wysokości nad poziom morza na podstawie pasm górskich Kordylierów i Andów (Daniel Stec)
15. Czynniki warunkujące wybór partnera a orientacja seksualna (Ewa Bobulska)
16. Testowanie hipotezy Białego Rycerza (Katarzyna Woch)
17. Czynniki wpływające na samoocenę masy ciała oraz postrzeganie masy ciała innych kobiet (Martyna Żurawiecka)
18. Poziom ekspresji a tempo ewolucji białek - empiryczna weryfikacja alternatywnych hipotez (Hanna Tutaj)
19. Behawioralne adaptacje do życia w mieście na przykładzie pajków (Krzysztof Miler)
20. Czy rozwój medycyny może prowadzić do epidemii chorób cywilizacyjnych? (Magdalena Żywicka)
21. Czy porosty mogą być wykorzystywane w monitoringu zanieczyszczenia pyłami zawieszonymi? (Paulina Wietrzyk)
22. Wpływ temperatury otoczenia na jakość snu (Anna Gądek)
23. Anatomia kości stopy w zależności od obuwia noszonego w dzieciństwie (Agnieszka Janas)
24. Wpływ intensywności zakażenia wolbachią na stopień niekompatybilności cytoplazmatycznej u owadów (Monika Prus)

TEMATY WYBRANE DO OPRACOWANIA I PODZIAŁ GRUP

1. „Śpięca Królowna” vs „Portret Doriana Greya” – wpływ modelu starzenia się na tempo ewolucji i dostosowanie u organizmów kryptobiotycznych:
DANIEL STEC, MONIKA PRUS, KAMILA ZAJĘC
2. Czy skład mikrobiomu przewodu pokarmowego wpływa na preferencje pokarmowe?:
HANNA TUTAJ, KRZYSZTOF MILER, KATARZYNA WOCH
3. Ciemne podniebienie u szczeniąt *Canis familiaris* wskaźnikiem agresywności u dorosłych osobników – prawda czy mit?:
ANNA GĄDEK, AGNIESZKA JANAS, PAULINA WIETRZYK
4. Czynniki wpływające na ocenę własnej masy ciała, a postrzeganie masy ciała u innych kobiet:
EWA BOBULSKA, MARTYNA ŻURAWIECKA, MAGDALENA ŻYWICKA



„ŚPIĄCA KRÓLEWNA” VS „PORTRET DORIANA GRAYA” - WPŁYW MODELU STARZENIA SIĘ NA TEMPO EWOLUCJI I DOSTOSOWANIE U ORGANIZMÓW KRYPTOBIOTYCZNYCH

PIERWOTNA WERSJA PROJEKTU ■

„ŚPIĄCA KRÓLEWNA” VS „PORTRET DORIANA GREYA” - WPŁYW MODELU STARZENIA SIĘ NA TEMPO EWOLUCJI I DOSTOSOWANIE U ORGANIZMÓW KRYPTOBIOTYCZNYCH

AUTORZY:

Monika Prus, Daniel Stec, Kamila Zając

STRESZCZENIE PROJEKTU:

1. Cel prowadzonych badań/hipoteza badawcza ■

Kryptobioza to stan spoczynku umożliwiający organizmowi przetrwanie niekorzystnych warunków środowiskowych. Jedną z form kryptobiozy jest anhydrobioza wywołwana przez brak lub niedobór wody w środowisku. Do organizmów anhydrobiotycznych można zaliczyć m.in. nicienie i niesporczaki. Zjawisko życia utajonego postrzegane jest jako zatrzymanie czasu i prewencja starzenia się. W literaturze istnieją jednakże dwa modele wyjaśniające, co dzieje się z organizmem podczas anhydrobiozy. Model „Śpiącej Królowny” zakłada brak starzenia się, natomiast model „Portret Dorian Greya” opisuje anhydrobiozę, w trakcie której organizm starzeje się. Pomimo licznych badań nad kryptobiozą wciąż niewiele wiadomo na temat ewolucyjnych konsekwencji przebiegu starzenia się według wyżej wymienionych modeli.

Celem projektu jest zbadanie wpływu anhydrobiozy na tempo ewolucji oraz zmiany dostosowania w zależności od modelu starzenia się.

Realizacja projektu pozwoli na zweryfikowanie następujących hipotez badawczych: 1) linie, nie będące w stanie anhydrobiozy (linie kontrolne) będą miały szybsze tempo ewolucji niż linie wprowadzone w stan anhydrobiozy, 2) linie poddane zarówno krótkim jak i długim epizodom anhydrobiozy będą miały wolniejsze tempo ewolucji niż linie kontrolne, 3) linie kontrolne będą miały niższe dostosowanie niż linie wprowadzane w stan anhydrobiozy.

2. Zastosowana metoda badawcza/metodyka ■

Badania będą prowadzone na dwóch gatunkach bezkręgowców: nicieniu *Panagrolaimus rigidus* oraz niesporczaku *Hypsibius dujardini*, które zostaną użyte do przetestowania modeli starzenia się, odpowiednio „Portret Dorian Greya” oraz „Śpiąca Królowna”. Pierwszym etapem będzie sprawdzenie wpływu długości anhydrobiozy na cykle życiowe obiektów badawczych. Umożliwi to wybranie właściwych długości trwania anhydrobiozy, które zostaną użyte w grupach eksperymentalnych. Projekt zakłada dokonanie analizy tempa ewolucji na podstawie zaobserwowanych różnic w genomach osobników na różnych etapach trwania ewolucji eksperymentalnej. Badane będą także cechy historii życiowych, przed i po eksperymencie, co pozwoli oszacować zmiany w dostosowaniu określonych linii.

3. Wpływ spodziewanych rezultatów na rozwój nauki, cywilizacji, społeczeństwa ■

Realizacja projektu pozwoli lepiej zrozumieć dynamikę ewolucji organizmów kryptobiotycznych oraz jak częstość i długość anhydrobiozy mogą przyczyniać się do zmian w dostosowaniu populacji. Efektem badań będą oryginalne prace badawcze, których publikacje planuje się w czasopiśmie z listy filadelfijskiej. Ponadto wyniki będą prezentowane na konferencjach krajowych i międzynarodowych. Projekt da możliwość zdobycia doświadczenia oraz pogłębienia wiedzy studentom zaangażowanym w jego realizację.

SKRÓCONY OPIS PROJEKTU:

1. Cel naukowy projektu ■

Proces starzenia się od zawsze był obiektem zainteresowania naukowców, którzy starali się zrozumieć mechanizmy powodujące starzenie się i związane z tym konsekwencje (Holden 2002). Według Hamiltona (1966), starzenie się jest definiowane jako zależna od wieku zdolność osobnika do reprodukcji oraz przeżycia. Proces starzenia się jest uważany za proces stopniowego zmniejszania zdolności organizmu do reagowania na stres środowiskowy występujący wraz z upływającym czasem. Starzenie się jest spowodowane nieodwracalnym gromadzeniem wewnątrzkomórkowych uszkodzeń, które nie mogą ulec naprawie i prowadzi do upośledzenia funkcjonowania komórek, tkanek, narządów oraz układów, a ostatecznie do śmierci organizmu.

Kryptobioza jest formą życia utajonego wywołanego przez niekorzystne warunki środowiska zewnętrznego w czasie którego metabolizm organizmu jest praktycznie niewykrywalny (Wright 2001). Stan kryptobiozy zostaje przerwany od razu po ustąpieniu niekorzystnych warunków środowiska. Istnieje kilka form kryptobiozy definiowanych ze względu na czynnik wywołujący, można wyróżnić anhydrobiozę (brak wody), kriobiozę (niska temperatura), osmobiozę (wysoka osmolarność środowiska zewnętrznego), anoksobiozę (niedobór tlenu) (Watanabe 2006). Zjawisko to występuje u wrotków (*Rotifera*), nicieni (*Nematoda*), niesporczaków (*Tardigrada*) oraz skorupiaków (*Arthropoda*) (Ricci i Pagani 1997, Ricci i in. 1987, Ricci 1998, Ricci i Covino 2005). Istnieją dwa prawdopodobne modele starzenia się u organizmów anhydrobiotycznych: model „Śpiącej Królowej” (*Sleeping Beauty*) oraz „Portret Dorian Greya” (*Picture of Dorian Grey*) (Ricci i Pagani 1997; Ricci i Covino 2005). W modelu „Śpiącej Królowej” organizmy nie starzeją się w trakcie anhydrobiozy, inaczej niż w przypadku modelu „Portret Dorian Greya” (Ricci i Pagani 1997). W wyniku działania tych przeciwstawnych mechanizmów w obu modelach możemy oczekiwać różnych konsekwencji ewolucyjnych.

Głównym celem projektu będzie zbadanie wpływu anhydrobiozy na tempo ewolucji w zależności od modelu starzenia.

Szczegółowe cele projektu, to:

1. Porównanie dostosowania osobników ancestralnych i osobników po ewolucji eksperymentalnej w obrębie każdego z modeli starzenia się - osobno „Śpiącej Królowej” oraz „Portretu Dorian Greya”.

2. Zbadanie tempa ewolucji linii kontrolnych i eksperymentalnych wprowadzonych w stan anhydrobiozy, które w zależności od eksperymentu podlegały dwóm różnym modelom starzenia się. Przeprowadzone badania pozwolą na weryfikację hipotez:

A. Linie, które nie będą w stanie anhydrobiozy (linie kontrolne) będą miały szybsze tempo ewolucji niż linie wprowadzone w stan anhydrobiozy.

B. Linie poddane krótszym epizodom anhydrobiozy będą miały szybsze tempo ewolucji niż linie przebywające w tym stanie dłużej.

C. Linie kontrolne będą miały niższe dostosowanie niż linie wprowadzane w stan anhydrobiozy.

2. Znaczenie projektu ■

Proces starzenia się odnosi się do złożonych organizmów wielokomórkowych, organizmy jednokomórkowe, które rozmnażają się przez podział komórki nie starzeją się (Kirkwood i Austad 2000), z wyjątkiem niektórych bakterii (Ackermann i in. 2003, Stewart i in. 2005). Badania nad procesem starzenia się prowadzone są w kontekście zrozumienia i zbadania tego procesu u ludzi. Do tego celu wykorzystuje się browarnicze i piekarskie drożdże (*Saccharomyces cerevisiae*), wywilżnię karłowatą potocznie zwaną muszką owocową (*Drosophila melanogaster*), nicienie (*Caenorhabditis elegans*), myszy (*Mus musculus*) i szczury

laboratoryjne (*Rattus norvegicus*). Hulbert i in. (2007) wskazują, że w trakcie procesu starzenia zachodzą endogenne, nieodwracalne i szkodliwe zmiany dla organizmu. Czynniki egzogeniczne mogą współdziałać z czynnikami endogenicznymi, wzmacniać ich skutki lub je zmniejszać. Ponadto starzenie się jest wynikiem obecności i działania różnych czynników podczas życia organizmu (Hulbert i in. 2007).

Istnieje wiele teorii tłumaczących proces starzenia się na poziomie fizjologicznym, komórkowym oraz molekularnym, a każda z nich tłumaczy proces starzenia się częściowo. Teoria zegara (także teoria zegara wewnętrznego) mówi o tym, że wewnętrzny zegar organizmu jest odpowiedzialny za wszystkie procesy zachodzące na różnych poziomach organizacji organizmu, kontroluje funkcjonowanie organizmu, rozmnażanie się oraz starzenie (Moore-Ede i in. 1984). Żyjące organizmy rozwinęły kilka mechanizmów działania zegara biologicznego jednakże ważność niektórych z teorii została zakwestionowana (Rensing i in. 2001). Natomiast teoria telomerów zakłada, że rejony telomeryczne na końcach chromosomów chronią je przed uszkodzeniami oraz przed fuzją z innymi chromosomami. Telomery stają się krótsze po każdym podziale komórki, co ostatecznie powoduje zaburzenia w cyklu komórkowym (Hemann i Greider 2000). Do innych teorii tłumaczących proces starzenia się należą teorie: 1) autoimmunologiczna, 2) uszkodzeń DNA, 3) epigenetyczna, 4) wolnych rodników, 5) akumulacji błędów, 6) mitochondrialnego starzenia się, 7) komórek rozrodczych (Walford 1969, Gensler i Bernstein 1981, Moore-Ede i in. 1984).

Anhydrobioza wywołwana przez brak wody w środowisku, daje organizmom możliwość przeżycia w niekorzystnych warunkach aż do momentu ich poprawy. Zaletami stanu anhydrobiozy jest wyższe dostosowanie, w tym płodność, zwiększona przeżywalność potomstwa, ułatwiona dyspersja na duże odległości, możliwość kolonizacji ekstremalnych jak również tymczasowych środowisk, ochrona przeciwko pasożytom oraz ułatwiony horyzontalny transfer genów (Ricci i Corvino 2005, Ricci i Fontaneto 2009). Dane literaturowe wskazują, że organizmy anhydrobiotyczne mogą przeżyć bardziej ekstremalne warunki niż te, z którymi spotykają się w środowisku naturalnym. Wydaje się, że proces ten zatrzymuje czas, jednakże wykazano, iż nie zawsze jest to prawdą. Zaproponowano dwa modele - „Śpiącej Królowej” oraz „Portret Doriany Greya”, które opisują wpływ anhydrobiozy na proces starzenia się organizmu (Ricci i Pagani 1997). Śpiąca Królowa autorstwa Charlesa Perrault to baśń, w której młoda księżniczka, w wyniku ukłucia w palec zapada w głęboki stuletni sen. Przebudzenie następuje pod wpływem pocałunku księcia a królowa budzi się nadal młoda mimo upływu czasu. Z kolei „Portret Doriany Greya” Oscara Wilde’a opowiada o młodym człowieku, którego piękno zainspirowało malarza do stworzenia jego portretu. Młodzieniec zażądał, aby portret starzał się zamiast niego, tak aby on sam mógł zachować młodość i witalność.

Pomimo wielu prac poświęconych tematowi starzenia się, odnajdujemy niewiele zajmujących się testowaniem przedstawionych modeli u organizmów kryptobiotycznych. Ricci i in. (1987) dowiedli, że u wrotka *Macrotrachela quadricornifera* czas trwania anhydrobiozy nie wpłynął na całkowitą płodność, długość życia i żywotność. Te badania potwierdziły także, że *M. quadricornifera* podczas anhydrobiozy nie ulega procesowi starzenia się (Ricci i in. 1987). Pigoń i Węglarska (1953) odkryły, że podczas anhydrobiozy niesporczaków ich metabolizm był na bardzo niskim poziomie, jednakże wykrywalny. Ricci i Pagani (1997) testowali trzy hipotetyczne modele wpływu anhydrobiozy na proces starzenia się u wolnożyjącego nicienia *Panagrolaimus rigidus*. Pierwszy model zakładał brak wpływu czasu spędzonego w anhydrobiozie na fizjologiczny wiek organizmu, drugi, że długość anhydrobiozy tylko częściowo wpływa na jego zmiany, natomiast trzeci, że organizmy starzeją się w trakcie całego czasu trwania spoczynku. Wyniki udowodniły, że u badanego nicienia w czasie krótkiej anhydrobiozy mamy do czynienia ciągłym starzeniem się, natomiast kiedy ten czas jest dłuższy, w pewnym momencie następuje zatrzymanie procesów starzenia się.

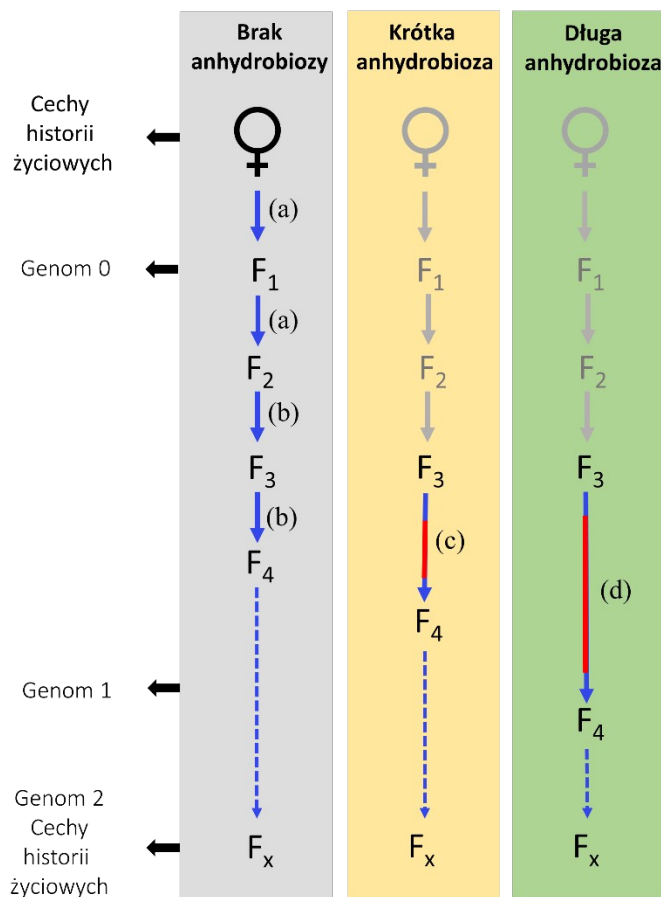
Wyniki zaproponowanego poniżej projektu badawczego przyczynią się do uzupełnienia luki w wiedzy na temat ewolucyjnych skutków anhydrobiozy. Zrealizowanie założonych celów badawczych pozwoli lepiej zrozumieć dynamikę ewolucji organizmów kryptobiotycznych. Dodatkowo dowiemy się czy częstość i długość anhydrobiozy może przyczyniać się do zmian w dostosowaniu populacji. Zdolność do przetrwania niekorzystnych warunków w okresie życia utajonego postrzegana jest za zaletę zwiększającą skuteczność kolonizacji nowych terenów.

3. Koncepcja i plan badań ■

W celu wykonania prezentowanego projektu zostały wybrane dwa modele zwierzęce. Pierwszym z

nim jest gatunek nicienia *Panagrolaimus rigidus* (Schneider, 1866) (Nematoda: Panagrolaimidae), na którym będzie testowany model starzenia „Portret Doriana Greya”. Powodem wyboru tego gatunku jest fakt, że można u niego zaobserwować oznaki starzenia się w początkowych fazach anhydrobiozy (Ricci i Pagani 1997). Drugim obiektem badawczym jest gatunek niesporczaka *Hypsibius dujardini* (Tardigrada: Hypsibiidae), na którym będzie testowany model starzenia „Śpiącej Królowej”.

Ogólny plan badań:



- A.** Badanie wpływu długości anhydrobiozy na cykle życiowe obiektów badawczych w celu dobrania właściwych długości jej trwania w planowanych eksperymentach.
- B.** Wyprowadzenie linii kontrolnych i eksperymentalnych z pojedynczych samic.
- C.** Przeprowadzenie eksperymentów, badanie cech historii życiowych (długość życia, całkowity sukces reprodukcyjny definiowany jako liczba składanych jaj dla pierwszego i ostatniego pokolenia ewolucji eksperymentalnej).
- D.** Sekwencjonowanie genomów *H. dujardini* oraz *P. rigidus* na początku eksperymentu, w połowie trwania każdego zabiegu ewolucji eksperymentalnej oraz po zakończeniu eksperymentu.
- E.** Analizy tempa ewolucji oraz zmian dostosowania we wszystkich zabiegach obu eksperymentów.
- F.** Prezentacja oraz publikacja wyników badań.

4. Metodyka badań ■

Prowadzenie hodowli

NIESPORCZAKI: *H. dujardini* będzie hodowany na szalkach Petriego zgodnie z metodą Stec i in. 2015. Hodowle podstawowe prowadzone będą na szlifowanych plastikowych szalkach o średnicy 5 cm, w stałej temperaturze 16 °C, przy stałym uwodnieniu oraz pokarmie podawanym ad libitum. Pokarm stanowić będzie mieszanka dwóch jednokomórkowych glonów (*Chlorella sp.*, *Chlorococcum sp.*). Osobniki hodowane będą na mieszance wody źródlanej „Żywiec” i wody destylowanej w proporcjach objętościowych 1:3, aby zapewnić niesporczakom dostęp do podstawowych składników mineralnych.

Wprowadzenie niesporczaków w stan anhydrobiozy odbywać się będzie poprzez odciążenie

niemal całego medium hodowlanego z szalki i pozostawienie jedynie cienkiej warstwy wody na dnie. Następnie szalki zostaną umieszczone w ekzykatorach, gdzie utrzymywana będzie wilgotność powietrza na poziomie 95%. Pozwoli to zapobiec nagłemu wyschnięciu szalki, co jak wykazali Boothby i in. 2017 miałyby negatywny wpływ na prawidłowe wejście w stan anhydrobiozy.

NICIENIE: Hodowla w czasie, gdy nie będą wykonywane eksperymenty prowadzona będzie w standardowych warunkach laboratoryjnych (20°C, ciemność) na agarozowych szalkach Petriego wysianych bakterią *Escherichia coli* (szczep OP50), która stanowi pokarm dla nicieni. Sprowadzony szczep nicienia *P. rigidus* będzie poddany w tym czasie około 30 pokoleniom poświęconym aklimatyzacji do warunków laboratoryjnych. W czasie eksperymentu korzystać będziemy z szalek Petriego wypełnionych pożywką płynną (bufor S wzbogaconym kulturami bakterii OP50).

Wprowadzenie w stan anhydrobiozy będzie wykonywane jednokrotnie w każdym pokoleniu według protokołu opisanego przez Ricci i in. 1987 (był używany także w Ricci i Pagani 1997) poprzez odwodnienie nicieni w szalkach Petriego przy użyciu papierowych filtrów nasączonych wodą dejonizowaną. Szalki z odwodnionymi nicieniami będą umieszczone na żelu krzemionkowym - pochłaniaczem wilgoci. Nawodnienie nicieni będzie następować poprzez dodanie do szalek pożywki płynnej wykorzystywanej do prowadzenia hodowli. Powrót do pełnej mobilności może potrwać kilka godzin.

Eksperyment badający model starzenia „Śpiąca Królowna”

Eksperyment zakłada stworzenie 3 grup eksperymentalnych po 10 linii (powtórzeń) w każdej z nich (Ryc.1): (1) grupa kontrolna – bez anhydrobiozy, (2) grupa z krótkimi, 10-dniowymi epizodami anhydrobiozy, (3) grupa z długimi, 40-dniowymi epizodami anhydrobiozy. Każda z linii zostanie utworzona z jednej samicy pochodzącej z równowiekowych jaj z hodowli podstawowej stale utrzymywanej w laboratorium. Następnie z kolejnego pokolenia przenoszonych będzie 20 losowo wybranych osobników z pokolenia wcześniejszego. Planowane jest przeprowadzenie ewolucji eksperymentalnej w każdej z grup przez 15 pokoleń, co potrwa maksymalnie 25 miesięcy w przypadku grupy 3, natomiast w przypadku grup 1 i 2 będzie on odpowiednio krótszy.

Eksperyment badający model starzenia „Portret Doriana Greya”

Eksperyment będzie przeprowadzony według takiego samego schematu, jak ten dotyczący modelu starzenia „Śpiąca Królowna” za wyjątkiem liczby osobników przenoszonych z pokolenia na pokolenia - w tym przypadku będzie to liczba 1000 osobników. Ewolucja eksperymentalna jest planowana również na okres 25 miesięcy, co pozwoli nam uzyskać maksymalnie 20 pokoleń w grupie 3.

Pomiary cech historii życiowych oraz określenie zmiany dostosowania

Jako cechy historii życiowych zostaną zmierzone: długość życia, całozyciowa liczba złożonych jaj. Pomiary cech historii życiowych zostaną wykonane dwukrotnie dla każdej z linii – w pokoleniu Fo i w pokoleniu F15 (model „Śpiącej Królowny”) i F20 (model „Portret Doriana Greya”) (patrz: Ryc. 1). Następnie wyliczona będzie zmiana dostosowania wyrażona w dwóch miarach: długości życia i całozyciowej liczby złożonych jaj. Wszystkie dziesięć samic z pokolenia Fo zostanie umieszczonych w indywidualnych dołkach na 24-dołkowych płytkach. Stan każdej samicy będzie sprawdzany co trzy dni w przypadku niesporczaków i codziennie w przypadku nicieni do momentu naturalnej śmierci każdej z nich. To samo badanie zostanie przeprowadzone dla dziesięciu samic z każdego zabiegu po ewolucji eksperymentalnej dla każdego modelu starzenia. Samice będą wybierane losowo po jednej z ostatniego pokolenia w każdym powtórzeniu danego zabiegu.

Sekwencjonowanie genomów

W związku z czasochłonnością eksperymentów ewolucji eksperymentalnej przedstawionej powyżej zdecydowaliśmy się na zlecenie sekwencjonowania genomów firmie zewnętrznej. Chcąc przeprowadzić ten etap samemu w naszym laboratorium byłibyśmy zmuszeni do zatrudnienia, co najmniej jednej osoby w pełnym wymiarze czasu pracy oraz studentów, którzy dostawaliby stypendium. Koszty ich wynagrodzenia byłyby porównywalne z kosztami wykonania tej usługi przez firmę zewnętrzną. Dodatkowo należy pamiętać, że najbardziej czasochłonnym i mogącym nas limitować etapem projektu będzie obróbka danych z sekwencjonowania nowej generacji (NGS). Planowane jest zsekwencjonowanie genomów około 150

osobników eksperymentalnych (przybliżone wyliczenia: 2 osobniki na powtórzenie w danej linii × 4 linie × 3 punkty czasowe × 3 zabiegi × 2 eksperymenty/modele starzenia się). Sekwencyjnie genomów będzie wykonane zostanie wysoce przepustową techniką z wykorzystaniem platformy Illumina. Obróbka danych będzie przeprowadzona na serwerze Galaxy z wykorzystaniem zaimplementowanych na nim narzędzi do składania, czyszczenia, przeszukiwania i porównywania genomów (Afgan i in. 2016). Kolejnym etapem będzie analiza tempa ewolucji poprzez porównanie ilości zmian w genomach na przestrzeni czasu.

5. Literatura ■

- Ackermann M., Stearns S. C., Jenal U. 2003. Senescence in a bacterium with asymmetric division. *Science* 300: 1920.
- Afgan E., Baker D., van den Beek M., Blankenberg D., Bouvier D., Čech M., Chilton J., Clements D., Coraor N., Eberhard C., Grüning B., Guerler A., Hillman-Jackson J., Von Kuster G., Rasche E., Soranzo N., Turaga N., Taylor J., Nekrutenko A., Goecks J. 2016. *The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2016 update*. *Nucleic Acids Research* 44: W3-W10.
- Boothby, T.C., Tapia, H., Brozena, A.H., Piszkiwicz, S., Smith, A.E., Giovannini, I., Rebecchi, L., Pielak, G.J., Koshland, D. & Goldstein, B. 2017. *Tardigrades Use Intrinsically Disordered Proteins to Survive Desiccation*. *Molecular Cell*, 65: 975-984.
- Gensler, H. L., Bernstein, H. 1981. *DNA Damage as the Primary Cause of Aging*. *The Quarterly Review of Biology*, 56: 279-303.
- Hamilton W. D. 1966. *The moulding of senescence by natural selection*. *J Theor Biol* 12:12-45.
- Hemann M. T., Greider C. W. 2000. *Wild-derived inbred mouse strains have short telomeres*. *Nucleic Acids Research* 28: 4474-8.
- Holden C. 2002. *The quest to reverse time's toll*. *Science*, 295: 1032-1033.
- Hulbert A. J., Pamplona R., Buffenstein R., Buttemer W. A. 2007. *Life and death: metabolic rate, membrane composition, and life span of animals*. *Physiol Rev.* 87:1175-1213.
- Kirkwood T. B., Austad S. N. 2000. *Why do we age?* *Nature* 408: 233-238.
- Moore-Ede M., Sulzman C., Fuller F. M., Charles A. 1984. *The Clocks that Time Us: Physiology of the Circadian Timing System*. Cambridge, Massachusetts: Harvard University Press. ISBN 0-674-13581-4.
- Pigoń A., Weglarska B. 1953. *The respiration of Tardigrada: a study in animal anabiosis*. *Bulletin de l'Academie Polonaise des Sciences. Cl. II* 1: 69-72.
- Reising, L., Meyer-Grahe, U. and Ruoff, P. 2001. *Biological timing and the clock metaphor: oscillatory and hourglass mechanisms*. *Chronobiology International*, 18: 329-369.
- Ricci C. 1998. *Anhydrobiotic capabilities of bdelloid rotifers*. *Hydrobiologia* 387/388: 321-326.
- Ricci C., Covino C. 2005. *Anhydrobiosis of Adineta ricciae: Costs and benefits*. *Hydrobiologia* 546: 307-314.
- Ricci C., Pagani M. 1997. *Desiccation of Panagrolaimus rigidus (Nematoda): survival, reproduction and the influence on the internal clock*. *Hydrobiologia* 347: 1-13.
- Ricci C., Fontaneto D. 2009. *The importance of being a bdelloid: Ecological and evolutionary consequences of dormancy*. *Italian Journal of Zoology* 76: 240-249.
- Ricci C., Vaghi L., Manzini M. L. 1987. *Desiccation of rotifers (Macrotrachela quadricornifera): survival and reproduction*. *Ecology* 68: 1488-1494.
- Stec D., Smolak R., Kaczmarek Ł. & Michalczyk Ł. 2015. *An integrative description of Macrobiotus paulinae sp. nov. (Tardigrada: Eutardigrada: Macrobiotidae: hufelandi group) from Kenya*. *Zootaxa*, 4052: 501-526.
- Stewart E. J., Madden R., Paul G., Taddei F. 2005. *Aging and death in an organism that reproduces by morphologically symmetric division*. *PLoS Biol.* 3: 295-300.
- Walford R. L. 1969. *The Immunological Theory of Aging*. Copenhagen: Munksgaard.
- Watanabe M. 2006. *Anhydrobiosis in invertebrates*. *Appl. Entomol. Zool.* 41: 15-31
- Wright J. C. 2001. *Cryptobiosis 300 years on from van Leuwenhoek: What have we learned about tardigrades?* *Zool. Anz.* 240: 563-582.

Kosztorys ■

	2018	2019	2020	Razem
1. Koszty bezpośrednie, wliczając:	538000	318000	268000	1124000
1/ Wynagrodzenia	108000	108000	108000	324000
2/ Aparatura	107000	-	-	107000
3/ Inne koszty bezpośrednie	323000	210000	160000	693000
2. Koszty pośrednie	86200	63600	53600	203400
Koszt całkowity (1+2)	624200	381600	321600	1327400

Uzasadnienie kosztów ■

Wynagrodzenia: 3 000 PLN x 12 miesięcy x 3 osoby x 3 lata = 324 000 PLN

Specjalistyczna aparatura badawcza: 107 000 PLN

- Autoklaw mikrofalowy: 12 000 PLN
- Laminar: 50 000 PLN
- Pipety automatyczne (2 zestawy pipet jednokanałowych i 2 pipety wielokanałowe): 19 000 PLN
- Zestawy komputerowe plus oprogramowanie systemowe i programy bioinformatyczne: 26 000 PLN

Inne koszty bezpośrednie: 703 000 PLN

Utrzymanie hodowli: 150 000 PLN

- Szkło laboratoryjne (autoklawowalne): 20 000 PLN

(zlewki, cylindry, pipety Pasteura, butelki o różnej pojemności)

- Plastik laboratoryjny: 80 000 PLN

(plastikowe szalki Petriego, płytki-24 dołkowe, końcówki do pipet automatycznych, probówki Eppendorfa, pudełka na probówki Eppendorfa, butelki)

- Inne: 50 000 PLN

(agar, bakterie, glony, taśma do autoklawu, odczynniki chemiczne do hodowli nicieni, ręczniki papierowe)

Materiały biurowe: 10 000 PLN

(papier i tusz do drukarki, koperty, długopisy, taśma klejąca, koszulki foliowe, segregatory)

Usługi zewnętrzne: 503 000 PLN

1. Sekwencjonowanie genomowe (z powodu braku dostępu do platformy sekwencjonowania nowej generacji oraz nieopłacalności spowodowanej kosztami wynagradzania dla dodatkowych pracowników w projekcie a także samego wynajmu platformy, wykonanie sekwencjonowania całych genomów zostanie zlecone firmie zewnętrznej; w projekcie planowane jest zsekwencjonowanie ~150 genomów): 500 000 PLN
2. Transport organizmu modelowego ze Stanów Zjednoczonych: 3 000 PLN

Konferencje: 30 000 PLN

Wyniki projektu będą prezentowane na międzynarodowych konferencjach (głównie przez kierowników) jak i krajowych (głównie przez studentów, co umożliwi im zdobycie doświadczenia w prezentowaniu wyników). Planowany jest udział w dwóch międzynarodowych i trzech krajowych konferencjach.

Open access: 10 000 PLN

(Niektóre czasopisma z wysokim wskaźnikiem wpływu wymagają opłaty za otwarty dostęp do artykułu. Planowane jest złożenie dwóch publikacji do takich czasopism)

RECENZJE ■

prof. dr hab. Ryszard Korona:

Mocne strony wniosku:

Zagadnienie jest ciekawe, czy okres obniżonej aktywności biologicznej wpływa na tempo starzenia się. Wydaje się być przy tym słabo przebadane, czyli warto podjąć. Projekt jest w zamyśle na pewno nowatorski. Jest też niewątpliwie ambitny, niestety chyba nadmiernie.

Słabe strony wniosku:

Czy na pewno sama koncepcja jest dobrze przemyślana? Sądząc ze schematu, wszystkie linie przejdą taki sam łączny okres aktywności a dwie linie będą dodatkowo miały krótki lub długi okres spoczynku. Czyli, spoczynek ma być okazją do selekcji na rejuwenalizację skoro to te spoczynkowe linie mają uzyskać wyższe dostosowanie. Nie byłoby to unikanie starzenia w spoczynku ale wręcz odzyskiwanie młodości.

Pomijając rzeczy drobne, widzę też kilka podstawowych błędów w planie badań.

1. Skąd zmienność genetyczna, potrzebna do działania doboru. Początkiem populacji ma być jedna samica, u obu organizmów. Jak rozumiem z ryciny, zachodzić będzie partenogeneza. Nie wiem czy amiktyczna, czy po mejozie i samozapłodnieniu. Gdyby zaczęto od dużej populacji złożonej z osobników różnych genetycznie, to mógłby zaistnieć dobór między klonami. Gdyby występowało rozmnażanie płciowe, to pojawiałaby się też zmienność rekombinacyjna (inne układy istniejących genów). W tym eksperymencie musiałyby się pojawiać nowe mutacje adaptatywne. U człowieka pojawia się około jednej mutacji w rejonach kodującym w linii generatywnej, od zygoty do zygoty. U bezkręgowców będzie tego kilka razy mniej. Ogromna większość to mutacje szkodliwe lub neutralne. Szkodliwe staną się homozygotami, jeśli istnieje samozapłodnienie. Wniosek: praktycznie nie będzie zmienności potencjalnie adaptatywnej, warianty szkodliwe mogą się utrwalić w chowie wsobnym.

2. Samo hodowanie to jeszcze nie selekcja naturalna lub sztuczna. Do następnego pokolenia osobniki mają być wybierane losowo. Jeżeli byłyby wybierane przez eksperymentatora ze względu na jakąś cechę, to byłaby selekcja sztuczna. Naturalna wtedy, gdyby o sukcesie decydowała wyższa płodność lub niższa śmiertelność. W jaki sposób miałyby się to ujawniać? Kto jest wgrany a kto przegrany, dlaczego? Czy jest wysoka śmiertelność, konkurencja o zasoby, kanibalizm? Nie podano żadnych wyjaśnień jak miałyby działać dobór naturalny.

3. Sekwencjonowanie nie jest cudownym środkiem na niewiedzę. Ono często pogłębia niewiedzę. Tak byłoby tutaj. Jak duże są te genomy? Czy genomy tych lub podobnych gatunków są zanalizowane tak by pomogły w tych analizach? Czy ma być analizowana cała sekwencja czy tylko egzom? Alignment całego genomu to gigantyczna i trudna praca, zwłaszcza dla gatunków nie modelowych. Nawet jeśli się zdarzy znaleźć mutację, to skąd będzie wiadomo, że jest w sekwencji kodującej lub regulatorowej i ma jakikolwiek związek z cechami historii życia. Mam wrażenie, że autorzy nawet nie podejrzewają jak trudne byłyby te analizy i jak wiele jeszcze muszą się nauczyć by je choćby wstępnie zaplanować, nie mówiąc o przeprowadzeniu ■

Anna Gądek:

Ocena merytoryczna projektu

Projekt ma charakter naukowy i spełnia kryterium badań podstawowych. Jest to projekt zawierający elementy nowatorskie, a wyniki przeprowadzonych badań mogą przyczynić się do uzupełnienia luki w wiedzy na temat ewolucyjnych skutków anhydrobiozy, co podkreślają autorzy projektu. Projekt wykonano rzetelnie. Wprowadzenie do tematu jest jasne i zrozumiałe, a modele zostały wyjaśnione w sposób logiczny. Wszystkie wymagane części projektu zostały uwzględnione. W nawiązaniu do planu badań sugerowałabym

wskazanie po jakim czasie planowana jest pierwsza publikacja oraz wyszczególnienie ilości planowanych publikacji.

Główny cel postawiony przez autorów zakłada zbadanie wpływu anhydrobiozy na tempo ewolucji w zależności od dwóch przeciwstawnych modeli starzenia w oparciu o dane dotyczące dwóch różnych organizmów. Wątpliwe wydaje się generalizowanie uzyskanych wyników dotyczących znaczenia ewolucyjnego bez sprawdzenia większej liczby gatunków, u których zjawisko anhydrobiozy jest odnotowywane. Ze względu na to, iż nie jest to moja dziedzina badawcza nie czuję się kompetentna by udzielać dodatkowych rad merytorycznych, aczkolwiek uważam że poruszone kwestie powinny zostać poddane dyskusji.

Ocena kosztorysu

Koszt planowanych badań jest bardzo wysoki. Pomimo, że kosztorys został uzasadniony, wydaje mi się, że miesięczne wynagrodzenie w kwocie 3000 zł dla osób rozpoczynających karierę naukową jest wygórowane. Ze względu na dużą kwotę przeznaczoną na finansowanie udostępnienia wyników w formie Open Access chciałam zwrócić uwagę na brak sprecyzowania docelowych czasopism, do których kierowane będą publikacje.

Ocena możliwości wykonania

Uważam, że projekt jest możliwy do wykonania. Badania zostały starannie zaplanowane i uzasadnione. Zastanawia mnie jednak czy całkowita kwota potrzebna do zrealizowania projektu nie jest zbyt wysoka.

Mocne strony wniosku

- jasne, zrozumiałe przedstawienie tematu ,
- sprecyzowana metodologia,
- logiczne hipotezy;

Słabe strony wniosku

- bardzo wysoki koszt planowanych badań,
 - brak sprecyzowania docelowych czasopism, do których kierowane będą publikacje,
1. obecne w całym tekście drobne literówki oraz błędy stylistyczne ■

Agnieszka Janas:

Ocena merytoryczna projektu

Projekt dotyczący analizy wpływu anhydrobiozy na tempo ewolucji u organizmów wykazujących dwa przeciwstawne modele starzenia zakłada wystąpienie odmiennych konsekwencji ewolucyjnych w każdym modelu. Opisane doświadczenie jest bardzo rozbudowane i generuje bardzo duże koszty, zasadne wydaje się zatem ograniczenie analizy do jednego z opisanych modeli: „Śpiąca królewna” lub „Portret Dorian Greya”. Ponadto wyniki mogą być bardziej miarodajne, gdyby zakładane zależności ewolucyjne potwierdziły się w przypadku danego modelu, ale u dwóch lub większej liczby różnych taksonów, u których obserwuje się anhydrobiozę i konkretny model starzenia. Porównanie obu modeli starzenia w oparciu o wyniki uzyskane z analizy przeprowadzonej na dwóch różnych organizmach nie pozwoli na wyciągnięcie ogólnych wniosków na temat anhydrobiozy. Bardziej uzasadnione byłoby zatem analizowanie dostosowania i ewolucji w przypadku jednego z modeli, ale dwóch różnych gatunków, u których ten model występuje, jednakże wątpliwa jest w tym przypadku redukcja kosztów.

Projekt spełnia wymagania badań podstawowych i został prawidłowo przedstawiony, niewielkim mankamentem są błędy językowe wynikające zapewne z pośpiechu podczas przygotowywania wniosku.

Ocena kosztorysu

Kosztorys pod względem formalnym jest przygotowany prawidłowo, aczkolwiek przedstawione

koszty są stanowczo zbyt wysokie. Wynagrodzenie przeznaczone dla wykonawców projektu Preludium jest zawyżone. Ponadto nie zostało uwzględnione wynagrodzenie dla studentów uczestniczących w projekcie, a zostało to wspomniane w części „Wpływ spodziewanych rezultatów na rozwój nauki, cywilizacji, społeczeństwa”.

Ocena możliwości wykonania

Opisany projekt potencjalnie jest możliwy do zrealizowania, aczkolwiek biorąc pod uwagę koszty, nie jest realne uzyskanie takiego finansowania. Konieczna wydaje się rezygnacja z któregoś z elementu doświadczenia, w celu ograniczenia kosztów.

Mocne strony wniosku

- dobre uzasadnienie wyboru organizmów do doświadczenia,
- bardzo dobra znajomość metodologii,
- bogata literatura;

Słabe strony wniosku

- nie do końca przemyślany problem badawczy,
- brak informacji na temat zakresu danych do publikacji oraz nazw czasopism, w których docelowo planowane jest opublikowanie wyników,
- obecność błędów interpunkcyjnych oraz składniowych w formularzu projektu ■

Krzysztof Miler:

Proponowany projekt dotyczy efektów kryptobiozy na tempo ewolucji i dostosowanie przy trzech różnych długościach okresów cyklicznego stanu uśpiania (jego braku, okresach krótkich i okresach długich) w który wprowadzane będą zwierzęta kolejnych pokoleń (ewolucja eksperymentalna). Do tego, proponowane jest przeprowadzenie badań na dwóch różnych modelach kryptobiozy, różniących się pod względem zachodzenia starzenia podczas uśpiania. To ambitny projekt i bez wątpienia sexy science. Szkoda, że projekt nie uwzględnia porównania obu typów kryptobiozy, dla których przeprowadzane są osobne eksperymenty na odrębnych gatunkach zwierząt. Zakładam, że powodem jest to, że nieznanym jest gatunek wykazujący zmienny model uśpiania. Jeśli tak, to warto o takim technicznym ograniczeniu we wniosku wspomnieć. Tak czy inaczej propozycja badań jest interesująca i wystarczająco rozbudowana nawet przy owym ograniczeniu. Podoba mi się, że autorzy poświęcili czas na rozrysowanie schematu ewolucji eksperymentalnej, wyraźną rozpiskę kosztów (adekwatnych) oraz jednolicie i dokładnie sformatowaną literaturę, co świadczy o skrupulatności w przygotowaniu wniosku.

Występuje jednak we wniosku kilka aspektów wymagających korekty. Po pierwsze, zamieszczony schemat wprowadza w błąd, gdyż sugeruje że finalna liczba pokoleń pomiędzy liniami różni się, podczas gdy z opisu metod jasno wynika, że będzie to 15 albo 20 pokoleń (w zależności od modelu kryptobiozy) w każdej linii, ale czas do osiągnięcia takiej liczby będzie różny w różnych liniach. To trzeba na schemacie uwzględnić. Po drugie, istnieje niespójność między hipotezami wypisanymi w streszczeniu i w skróconej części projektu. Hipoteza 1 odpowiada hipotezie A natomiast hipoteza 3 hipotezie C, ale hipoteza 2 jest inna niż hipoteza B i tylko B wydaje się mieć sens. Należy to uzgodnić. Po trzecie, mam wątpliwość co do testu dotyczącego cech historii życiowej (długości życia i składane jaja). Brakuje poparcia tego elementu badań cytacjami metodyki i trudno stwierdzić, czy proponowane metody są standardowe. Należy czytelnika przekonać, dlaczego wyznaczanie krzywej przeżywania co trzy dni zamiast codziennie jest zasadne, a ponadto wykluczyć możliwość, by samica umieszczona na płytce i składająca jaja zjadała swoje potomstwo (aktualnie w tej części metod w ogóle brakuje wzmianki o tym, jak będzie mierzone składanie jaj). Po czwarte, w projekcie pominięta jest kwestia analizy statystycznej, co należy koniecznie uzupełnić. Po piąte, myślę że dobrze będzie we wniosku uwzględnić jedną dodatkową rzecz, a mianowicie wyjaśnić czytelnikowi dlaczego (najlepiej na przykładzie eksperymentalnym i naturalnym) linie wchodzące w kryptobiozę mają mieć wyższe dostosowanie niż linie kontrolne, co jest nieintuicyjne.

Myślę, że proponowany projekt skorzysta na uwzględnieniu powyższych uwag oraz korekcie stylu i literówek. Przewiduję, że końcowa wersja będzie przykładem poprawnie rozpisanej propozycji badań ■

Hanna Tutaj:

Projekt podejmuje ciekawą tematykę związaną ze starzeniem się organizmów, która może zainteresować szerokie grono odbiorców, zarówno naukowców bezpośrednio zainteresowanych zagadnieniem, jak i przeciętnego Kowalskiego, ponieważ zjawisko starzenia się dotyczy wszystkich organizmów. Cel naukowy projektu jest jasno sprecyzowany i odpowiednio uzasadniony. Dodatkowym atutem projektu byłoby porównanie badanych modeli starzenia się, co jednak wymagałoby zastosowania tego samego modelu badawczego.

Uwagi, które nasunęły mi się po przeczytaniu projektu:

- Hipotezy badawcze przedstawione w opisie celu naukowego projektu są jasno sprecyzowane, ale przesłanki, które skłoniły autorów do postawienia akurat takich hipotez nie są dostatecznie wyjaśnione.
- Hipotezy badawcze w streszczeniu projektu różnią się od hipotez postawionych w skróconym opisie projektu - w streszczeniu hipoteza pierwsza i druga są tak naprawdę jedną hipotezą zapisaną innymi słowami.
- Autorzy chcą testować model „Portretu Dorian Greya”, aczkolwiek w przeciwieństwie do innego modnego w ostatnich czasach Greya, nazwisko Dorian zapisuje się „Gray”.
- Autorzy piszą, że starzeją się tylko organizmy wielokomórkowe i niektóre bakterie. Nie jest to prawdą. Np. u drożdży *Saccharomyces cerevisiae*, będących eukariotycznym organizmem jednokomórkowym, obserwuje się starzenie, o czym co zresztą autorzy pośrednio informują, mówiąc o badaniu procesu starzenia na drożdżach piekarskich - nielogicznym byłoby badanie procesu u organizmu, u którego dany proces nie zachodzi.
- W liniach 102-103 autorzy, cytując Ricci i Corvino 2005 oraz Ricci i Fontaneto 2009, mówią, że jedną z zalet stanu anhydrobiozy jest wyższe dostosowanie. Skoro wiadomo, że z anhydrobiozą wiąże się wyższe dostosowanie, to czy hipoteza o tym, że linie kontrolne będą miały niższe dostosowanie niż linie wprowadzane w stan anhydrobiozy jest zasadna?
- Skoro arbitralnie wybrano długości epizodów anhydrobiozy (10 i 40 dni), to pierwszy eksperyment, mający na celu dobranie właściwych długości trwania anhydrobiozy nie jest chyba potrzebny.
- Ryc. 1. uatrakcyjnia wygląd wniosku, jednak mam wrażenie, że nie objaśnia przebiegu eksperymentu dokładniej niż sam opis.
- Autorzy planują przeprowadzić sekwencjonowanie kilkuset genomów, co jest bardzo ambitnym, ale zarazem kosztownym i czasochłonnym przedsięwzięciem. Istnieją inne, mniej kosztowne i łatwiejsze do zaimplementowania metody, pozwalające na analizowanie zmienności sekwencji. Jedną z nich jest np. metoda mikromacierzy DNA (Gresham D, Dunham MJ, Botstein D. Comparing whole genomes using DNA microarrays. *Nat Rev Genet.* 2008;9:291–302). Zmiana sposobu analizy wyników ewolucji eksperymentalnej pozwoliłaby na zmniejszenie niebagatelnej sumy 500 000 PLN przeznaczonej na sekwencjonowanie nowej generacji. Pozostałe koszty wydają się być dobrze uzasadnione.
- Brak jest informacji o planowanych analizach statystycznych uzyskanych wyników.
- Zrozumienie projektu utrudnia szereg błędów stylistycznych, nieprecyzyjnych i zbyt potocznych sformułowań (np. wiersze 233-234, określenia „odciągnięcie (...) medium”, czy laminar).

Projekt uważam za ciekawy i poprawnie zaplanowany. Po odpowiednich poprawkach dotyczących metodyki i strony stylistycznej wniosku rekomendowałabym finansowanie ■

Martyna Żurawiecka:

Tytuł projektu ze względu na metafory literackie wpływa pozytywnie na zainteresowanie tematyką. Należy zwrócić uwagę, iż projekt ma charakter naukowy, a ponadto spełnia kryterium badań podstawowych. Autorzy zastosowali się do kolejności poszczególnych części projektu i zmieścili się w ramach objętościowych, nie przekraczając limitu 5 stron, jednocześnie w klarowny sposób zaprezentowali swój pomysł. Niewątpliwie wniosek został przygotowany rzetelnie pomimo paru błędów interpunkcyjnych, które zapewne wynikają ze zbyt małej ilości czasu przeznaczanej na napisanie projektu. Poziom naukowy badań oceniam na bardzo dobry, autorzy mają szanse na publikację wyników badań w renomowanych czasopiśmie z listy JCR. Projekt wykorzystuje już wcześniej opracowane modele, jednakże zawiera elementy nowatorskie. Wpływ realizacji projektu badawczego na rozwój dyscypliny naukowej oceniam jako umiarkowany, ze względu na to, iż nie jest on w stu procentach nowatorski. Projekt ma bardzo dużą możliwość realizacji. Streszczenie projektu jest obszerne i podzielone na podrozdziały co powoduje brak płynnego przejścia. Cel naukowy projektu sformułowany jest w zrozumiały i klarowny sposób.

Fragment dotyczący znaczenia projektu napisany jest w dość chaotyczny sposób, a pomiędzy kolejnymi częściami nie ma spójnego przejścia. Na początku autorzy piszą na temat procesów starzenia, a zaraz potem przechodzą do anhydrobiozy, daje to wrażenie tłumaczenia pojęć jak z encyklopedii. Jednakże w kolejnej części autorzy w klarowny i umiejętny sposób tłumaczą model "Śpiącej Królowej" i "Portret Dorian Grey", który jest niezbędny dla prawidłowego zrozumienia tematyki planowanych badań. W projekcie autorzy podkreślają sensowność swoich badań, gdyż będą one uzupełnieniem luki w wiedzy na temat ewolucyjnych skutków anhydrobiozy.

W koncepcji i planie badań w jasny sposób umotywowany jest wybór dwóch organizmów, na których badania będą przeprowadzane. A ponadto przedstawienie badań w sposób graficzny pozwala na szybkie zapoznanie się z koncepcją autorów. Niewątpliwie jest to część przygotowana bardzo rzetelnie i logicznie. W metodyce badań mamy pewność, że jeden z autorów jest osobą, która ma doświadczenie w pracy z wybranym do badań modelem zwierzęcia bezkręgowego, ze względu na cytację przygotowanego przez niego artykułu.

W metodyce badań autorzy nie ujęli jednak analizy statystycznej, nie przedstawili testów statystycznych, które będą wykorzystywać oraz nie wytłumaczyli dlaczego do badań będzie im potrzebna właśnie konkretnie woda "Żywiec". Myślę, że to dlaczego taką a nie inną wodę wybrali może być bardzo interesujące, zastanawiam się czy to ze względu na osobiste preferencje autorów. Literatura i cytacje przygotowane są w sposób prawidłowy. Autorzy są zaznajomieni z tematyką i dokonali niezbędnego sprawdzenia badań w zakresie, który wybrali.

Odnośnie kosztorysu proponowałabym autorom zastanowienie się czy koszty przeznaczone na materiały biurowe nie są zbyt wysokie. Bardzo dobrą decyzją jest zlecenie zewnętrzne zsekwencjonowania genomów ■

Magdalena Żywicka:

Nie ulega wątpliwości, iż tematyka, jaką planują zbadać autorzy powyższego projektu, ma charakter badań podstawowych. Głębsze poznanie mechanizmów kryptobiozy może jednak stanowić podwaliny pod kontynuację prac nad procesami starzenia u człowieka, co niewątpliwie miałyby duże znaczenie społeczne. Z pewnością jest to silną stroną projektu, która bynajmniej nie sugeruje jego bezpośredniej aplikacyjności. Z tej perspektywy dobór tematu badań jest zarówno właściwy, jak i ważny. Pozytywnie należy ocenić fakt, iż zjawisko kryptobiozy, procesów starzenia, jak i proces samego przeprowadzenia badań zostały przedstawione dość klarownie, co sprawia, że tematyka ta staje się przystępna niemalże dla każdego odbiorcy, dysponującego podstawową wiedzą biologiczną. Taka forma znacznie ułatwia analizę wniosku.

Dostrzegalnym mankamentem są liczne błędy językowe, szczególnie na poziomie interpunkcji. Chwilami utrudniają one odbiór czytanego tekstu, gdyż poprzez brak przecinków pewne zdania mogą być niejasne i wymagają od czytelnika głębszej analizy. Jest to jednakże zrozumiałe ze względu na fakt, iż presja czasu znacząco utrudnia wykonanie rzetelnej korekty tekstu. Mimo to przeprowadzenie edycji językowej wniosku z pewnością ułatwiłoby jego odbiór i wpłynęło pozytywnie na odczucia odbiorcy względem prezentowanego projektu.

Wniosek zawiera wszystkie konieczne elementy. Podział streszczenia na trzy bloki może ułatwić wstępne zapoznanie się z tematem projektu. Długość streszczenia jest właściwie dostosowana do objętości całego wniosku. Jedynym mankamentem, jaki można przypisać tej części projektu, jest zbyt słabe podkreślenie jego nowatorskości oraz znaczenia dla rozwoju nauki. Rozwinięcie tego tematu – na przykład kosztem części teoretycznego wstępu streszczenia, - powinno lepiej przyciągnąć uwagę czytelnika i przekonać go, iż planowane badania rzeczywiście powinny zostać zrealizowane.

W skróconym opisie projektu znów pojawia się ten sam problem, który widoczny jest w streszczeniu. Po raz kolejny bardzo słabo podkreślono nowatorskość badań oraz to, iż wypełniają one lukę w istniejącej aktualnie wiedzy na temat kryptobiozy i procesów starzenia. Przy mocno rozbudowanym opisie istniejącego stanu wiedzy zupełnie pominięto aspekt zakresu, który w tej chwili nie jest jeszcze znany nauce. Umieszczenie tego elementu wpłynie pozytywnie na uzasadnienie wartości podejmowanych badań.

Zaletą bloku przedstawiającego koncepcję i plan badań jest skrótowość i koherentność formy. Umieszczenie schematu wizualnego eksperymentów oraz wypunktowanie kolejnych kroków projektu znacząco ułatwia szybką orientację w zaprezentowanym procesie badawczym. Rzuca się jednak w oczy brak uzasadnienia doboru gatunku niesporczaka, jako jednego z badanych organizmów. W domyśle pozostaje fakt, iż prawdopodobnie jest on wysoce reprezentatywny dla modelu „Sleeping Beauty”, być może także łatwy w hodowli lub wprowadzaniu w stan anhydrobiozy. Wskazane jest wyraźne opisanie podstaw wyboru, podobnie jak dokonano tego w przypadku nicienia. Umieszczenie cytacji także dodałoby wiarygodności rzeczonemu uzasadnieniu.

Opis metodyki badań z pewnością wymaga uzupełnienia kilku informacji. Wybór wody źródlanej firmy „Żywiec” również nie został uzasadniony. Sugerowane jest podanie informacji dlaczego jej skład jest właściwym źródłem składników mineralnych dla opisanego gatunku niesporczaków. Brakuje także wiadomości w jaki sposób pozyskane zostaną osobniki H. dujardni. Można założyć, iż informacja o konieczności zakupu nicieni i wyprowadzenia odpowiedniej liczby pokoleń dla aklimatyzacji linii w sposób pośredni wskazuje, iż niesporczaki nie będą wymagały analogicznych procedur. Czy oznacza to, że znajdują się one na stanie jednostek badawczych zespołu? Kolejną wątpliwością pozostaje to, dlaczego wprowadzenie w stan anhydrobiozy obu gatunków ma zostać wykonane dwiema różnymi metodami. Odbiorca może założyć, iż wynika to z różnic fizjologicznych pomiędzy nicieniami, a niesporczakami, należałoby jednak wytłumaczyć jaka jest ich podstawa i z jakiego względu dobrane zostały konkretne metody.

Trzy ważne kwestie, które powinny zostać umieszczone w opisie koncepcji badań i/lub metodyki, zostały pominięte. Wniosek wymaga uzupełnienia o informacje na temat planowanych metod statystycznych, jakimi przetestowane zostaną hipotezy. Nie pojawia się także jasno sprecyzowana wiadomość na temat tego, w jakiej liczbie publikacji oraz konferencji zaprezentowane zostaną wyniki. Informacja ta pojawia się co prawda w kosztorysie, jednak niezwykle przydatne byłoby umieszczenie jej w którejś z wcześniejszych części projektu. Wskazane jest także rozwinięcie planów przedstawienia wyników, gdyż określenie, iż mają być one zaprezentowane w czasopiśmie z listy filadelfijskiej jest stwierdzeniem bardzo ogólnym. Podanie przykładowych tytułów periodyków, które mogłyby opublikować uzyskane wyniki, z pewnością ułatwiłoby ocenę wniosku. Kolejną luką jest pominięcie opisu czasowego rozkładu planowanego projektu. Dobrze byłoby przynajmniej zarysować na wykonanie jakich procedur poświęcony zostanie trzyletni okres realizacji badań.

Wykonanie projektu jest bardzo realne, zaś podjęcie opisanej tematyki uzasadnione. Uzupełnienie i

sprecyzowanie brakujących informacji sprawiłoby, iż plan badań będzie kompletny, a jego ocena przez recenzenta znacznie łatwiejsza. Mimo drobnych niedociągnięć przedstawiony projekt można ocenić jako dobry i przekonujący, iż jest on wart realizacji. ■

FINALNA WERSJA PROJEKTU ■

„ŚPIĄCA KRÓLEWNA” VS „PORTRET DORIANA GRAYA” - WPŁYW MODELU STARZENIA SIĘ NA TEMPO EWOLUCJI I DOSTOSOWANIE U ORGANIZMÓW KRYPTOBIOTYCZNYCH

AUTORZY:

Monika Prus, Daniel Stec, Kamila Zając

STRESZCZENIE PROJEKTU:

1. Cel prowadzonych badań/hipoteza badawcza ■

Kryptobioza jest stanem spoczynku umożliwiającym organizmowi przetrwanie niekorzystnych warunków środowiskowych. Jedną z jej form jest anhydrobioza wywoływana przez brak lub niedobór wody w środowisku. Do organizmów anhydrobiotycznych można zaliczyć m.in. nicienie i niesporczaki. Zjawisko życia utajonego postrzegane jest jako zatrzymanie czasu i prewencja starzenia się. W literaturze możemy natknąć się na dwa modele wyjaśniające nam, co dzieje się z organizmem podczas anhydrobiozy. Model „Śpiącej Królowej” zakłada brak starzenia się w czasie spoczynku, natomiast model „Portret Doriany Graya” opisuje anhydrobiozę, w trakcie której organizm się starzeje. Pomimo licznych badań nad kryptobiozą wciąż niewiele wiadomo na temat ewolucyjnych konsekwencji przebiegu starzenia się według wyżej wymienionych modeli.

Celem projektu jest zbadanie wpływu anhydrobiozy na tempo ewolucji oraz zmiany dostosowania w obrębie każdego z modeli starzenia się.

Realizacja projektu pozwoli na zweryfikowanie następujących hipotez badawczych: 1) linie niebędące w stanie anhydrobiozy (linie kontrolne) będą miały szybsze tempo ewolucji niż linie wprowadzone w stan anhydrobiozy, 2) linie poddane krótszym epizodom anhydrobiozy będą miały szybsze tempo ewolucji niż linie przebywające w tym stanie dłużej, 3) osobniki z linii kontrolnych będą miały niższe dostosowanie niż linie wprowadzane w stan anhydrobiozy.

2. Zastosowana metoda badawcza/metodyka ■

Badania będą prowadzone na trzech gatunkach bezkręgowców. Do przetestowania modelu „Portret Doriany Graya” użyjemy nicienia *Panagrolaimus rigidus*, a do modelu „Śpiąca Królowa” wrotka *Adineta ricciae* oraz niesporczaka *Hypsibius dujardini*. Pierwszym etapem będzie sprawdzenie wpływu długości anhydrobiozy na cykle życiowe obiektów badawczych. Umożliwi to wybranie właściwych długości trwania anhydrobiozy, które zostaną użyte w grupach eksperymentalnych. Projekt zakłada dokonanie analizy tempa ewolucji na podstawie zaobserwowanych różnic w genomach linii eksperymentalnych i kontrolnych. Badane będą także cechy historii życiowych, zarówno przed i po eksperymencie, co pozwoli oszacować zmiany w dostosowaniu określonych linii.

3. Wpływ spodziewanych rezultatów na rozwój nauki, cywilizacji, społeczeństwa ■

Realizacja projektu pozwoli lepiej zrozumieć dynamikę ewolucji organizmów kryptobiotycznych oraz jak częstość i długość anhydrobiozy mogą przyczynić się do zmian w dostosowaniu. Efektem badań będą oryginalne prace badawcze, których publikacje planuje się w czasopiśmie z listy filadelfijskiej. Ponadto wyniki będą prezentowane na konferencjach krajowych i międzynarodowych. Projekt da możliwość zdobycia doświadczenia oraz pogłębienia wiedzy studentom zaangażowanym w jego realizację.

SKRÓCONY OPIS PROJEKTU:

1. Cel naukowy projektu ■

Proces starzenia się od zawsze był obiektem zainteresowania naukowców, którzy starali się zrozumieć powodujące go mechanizmy i związane z tym konsekwencje (Holden 2002). Uważany jest za proces stopniowego zmniejszania zdolności organizmu do reagowania na stres środowiskowy, postępujący wraz z upływającym czasem. Starzenie się jest spowodowane nieodwracalnym gromadzeniem wewnątrzkomórkowych uszkodzeń, które nie mogą ulec naprawie, co prowadzi do upośledzenia funkcjonowania komórek, tkanek, narządów oraz układów, a ostatecznie do śmierci organizmu.

Kryptobioza jest formą życia utajonego wywołanego przez niekorzystne warunki środowiska zewnętrznego, w czasie którego metabolizm organizmu jest bardzo spowolniony, ale wciąż wykrywalny (Wright 2001). Stan ten zostaje przerwany zaraz po ustąpieniu niekorzystnych warunków środowiska. Wyróżnić możemy kilka form kryptobiozy ze względu na czynnik ją wywołujący: anhydrobiozę (brak wody), kriobiozę (niska temperatura), osmobiozę (wysoka osmolarność środowiska zewnętrznego), anoksybiozę (niedobór tlenu) (Watanabe 2006). Ze zjawiskiem tym możemy się spotkać u wrotków (Rotifera), nicieni (Nematoda), niesporczaków (Tardigrada) oraz skorupiaków (Arthropoda) (Ricci i Pagani 1997, Ricci i in. 1987, Ricci 1998, Ricci i Covino 2005). U organizmów anhydrobiotycznych istnieją dwa prawdopodobne modele starzenia się: model „Śpiącej Królowy” (Sleeping Beauty) oraz „Portret Dorian Gray” (Picture of Dorian Gray) (Ricci i Pagani 1997; Ricci i Covino 2005). W modelu „Śpiącej Królowy” organizmy nie starzeją się w trakcie anhydrobiozy, w przeciwieństwie do modelu „Portret Dorian Gray” (Ricci i Pagani 1997). W wyniku działania tych przeciwstawnych mechanizmów w obu modelach możemy oczekiwać różnych konsekwencji ewolucyjnych.

Głównym celem projektu będzie zbadanie wpływu anhydrobiozy na tempo ewolucji w zależności od modelu starzenia.

Szczegółowe cele projektu, to:

1. Porównanie dostosowania osobników z linii ancestralnych i z linii po ewolucji eksperymentalnej w obrębie każdego z modeli starzenia się - osobno „Śpiącej Królowy” oraz „Portretu Dorian Gray”.

2. Zbadanie tempa ewolucji linii kontrolnych i eksperymentalnych wprowadzonych w stan anhydrobiozy, które w zależności od eksperymentu podlegały dwóm różnym modelom starzenia się.

Przeprowadzone badania pozwolą na weryfikację hipotez:

A. Linie, które nie będą w stanie anhydrobiozy (linie kontrolne) będą miały szybsze tempo ewolucji niż linie wprowadzone w stan anhydrobiozy.

B. Linie poddane krótszym epizodom anhydrobiozy będą miały szybsze tempo ewolucji niż linie przebywające w tym stanie dłużej.

C. Osobniki z linii kontrolnych będą miały niższe dostosowanie niż linie wprowadzane w stan anhydrobiozy.

2. Znaczenie projektu ■

Proces starzenia się zaobserwować możemy głównie u organizmów wielokomórkowych. Organizmy jednokomórkowe, które rozmnażają się przez podział komórki nie starzeją się (Kirkwood i Austad 2000), za wyjątkiem niektórych bakterii i drożdży *Saccharomyces cerevisiae* (Sinclair i in. 1998, Ackermann i in. 2003, Stewart i in. 2005). Badania procesu starzenia na takich organizmach [m. in. browarnicze i piekarskie drożdże (*Saccharomyces cerevisiae*), muszka owocowa (*Drosophila melanogaster*), nicienie (*Caenorhabditis elegans*), myszy (*Mus musculus*), szczury laboratoryjne (*Rattus norvegicus*)] prowadzone są głównie w kontekście zrozumienia i zbadania tego zjawiska u ludzi. Istnieje wiele teorii tłumaczących proces starzenia się na poziomie fizjologicznym, komórkowym oraz molekularnym. Teoria zegara, zwana także teorią zegara wewnętrznego, mówi o tym, że kontroluje on wszystkie procesy zachodzące na różnych poziomach organizacji organizmu, w tym także starzenie się (Moore-Ede i in. 1984). Kolejną, jest teoria telomerów zakładająca, że rejony telomeryczne na końcach chromosomów chronią je przed uszkodzeniami oraz przed fuzją z innymi chromosomami. Telomery bowiem stają się krótsze po każdym podziale komórki, co ostatecznie powoduje zaburzenia w cyklu komórkowym (Hemann i Greider 2000). Do innych teorii tłumaczących proces starzenia się należą także teorie: 1) uszkodzeń DNA, 2) wolnych rodników (ROS), 3)

epigenetyczna, 4) autoimmunologiczna, 5) akumulacji błędów, 6) mitochondrialnego starzenia się, 7) komórek rozrodczych (Walford 1969, Gensler i Bernstein 1981, Moore-Ede i in. 1984).

Wywoływana przez brak wody w środowisku anhydrobioza daje organizmom możliwość przeżycia w niekorzystnych warunkach aż do momentu ich poprawy. Zaletami tego stanu może być wyższe dostosowanie, w tym płodność, zwiększona przeżywalność potomstwa, ułatwiona dyspersja na duże odległości, możliwość kolonizacji ekstremalnych, jak również tymczasowych środowisk, ochrona przeciwko pasożytom oraz ułatwiony horyzontalny transfer genów (Ricci i Corvino 2005, Ricci i Fontaneto 2009). Dane literaturowe wskazują, że organizmy anhydrobiotyczne mogą przeżyć bardziej ekstremalne warunki niż te, z którymi spotykają się w środowisku naturalnym. Wydaje się, że proces ten zatrzymuje czas, jednakże wykazano, że nie zawsze jest to prawdą. Zaproponowano dwa modele - „Śpiącej Królowny” oraz „Portret Doriana Graya”, które opisują wpływ anhydrobiozy na proces starzenia się organizmu (Ricci i Pagani 1997). Śpiąca Królowna autorstwa Charlesa Perrault to baśń, w której młoda królowna, w wyniku ukłucia w palec zapada w głęboki stuletni sen. Przebudzenie następuje pod wpływem pocałunku księcia, a królowna budzi się nadal młoda, mimo upływu czasu. Z kolei „Portret Doriana Graya” Oscara Wilde’a opowiada o młodym człowieku, którego piękno zainspirowało malarza do stworzenia jego portretu. Młodzieniec zażądał, aby portret starzał się zamiast niego, tak aby on sam mógł zachować młodość i witalność.

Pomimo wielu prac poświęconych zagadnieniu starzenia się, niewiele jest tych, które zajmują się testowaniem przedstawionych modeli u organizmów kryptobiotycznych. Ricci i in. (1987) pokazali, że czas trwania anhydrobiozy nie wpływa na całkowitą płodność, długość życia i żywotność wrotka *Macrotrachela quadricornifera*. Te badania potwierdziły także, że *M. quadricornifera* podczas anhydrobiozy nie ulega procesowi starzenia się (Ricci i in. 1987). Pigoń i Węglarska (1953) odkryły, że podczas anhydrobiozy niesporczaków ich metabolizm bardzo zwalnia, ale mimo to wciąż jest wykrywalny. Ricci i Pagani (1997) testowali trzy hipotetyczne modele starzenia się w czasie anhydrobiozy u wolnożyjącego nicienia *Panagrolaimus rigidus*. Wyniki pokazały, że u badanego nicienia w czasie krótkiej anhydrobiozy mamy do czynienia z ciągłym starzeniem się, natomiast kiedy czas anhydrobiozy jest dłuższy, w pewnym momencie następuje zatrzymanie procesów starzenia się.

Wyniki zaproponowanego poniżej projektu badawczego przyczynią się do uzupełnienia luki w wiedzy na temat ewolucyjnych skutków anhydrobiozy. Pomimo tego, że badacze podejmowali już próby zbadania wpływu anhydrobiozy na cechy historii życiowych rodziców i ich potomstwa (np. Ricci i Cavino 2005), wciąż nie są znane długotrwałe efekty cyklicznych epizodów anhydrobiozy. Wykorzystanie dwóch gatunków w eksperymencie poświęconym modelowi „Śpiąca Królowna” pozwoli nam na silniejsze wnioskowanie. Zrealizowanie założonych celów badawczych pozwoli lepiej zrozumieć dynamikę ewolucji organizmów kryptobiotycznych. Dodatkowo dowiemy się czy częstość i długość anhydrobiozy może przyczyniać się do zmian w dostosowaniu. Zdolność do przetrwania niekorzystnych warunków w okresie życia utajonego postrzegana jest za zaletę zwiększającą skuteczność kolonizacji nowych terenów.

3. Koncepcja i plan badań ■

W celu wykonania prezentowanego projektu zostały wybrane trzy modele zwierzęce. Pierwszym z nich jest gatunek nicienia *Panagrolaimus rigidus* (*Nematoda: Panagrolaimidae*), na którym będzie testowany model starzenia „Portret Doriana Graya”. Powodem wyboru tego gatunku jest fakt, że można u niego zaobserwować oznaki starzenia się w początkowych fazach anhydrobiozy (Ricci i Pagani 1997). Do testowania modelu starzenia „Śpiącej Królowny” wykorzystamy populację gatunek niesporczaka *Hypsibius dujardini* (*Tardigrada: Hypsibiidae*) i wrotka *Adineta ricciae* (*Rotifera: Adineta*). Powodem wyboru tych dwóch gatunków jest to, że możemy zaobserwować u nich brak procesu starzenia się w czasie anhydrobiozy.

Ogólny plan badań

- A. Badanie wpływu długości anhydrobiozy na cykle życiowe obiektów badawczych w celu dobrania właściwych długości jej trwania w planowanych eksperymentach.
- B. Wyprowadzenie linii kontrolnych i eksperymentalnych.
- C. Przeprowadzenie eksperymentów, badanie cech historii życiowych osobników (długość życia, całkowity sukces reprodukcyjny definiowany jako liczba składanych jaj – mierzone w pierwszym i ostatnim

pokoleniu ewolucji eksperymentalnej).

D. Analiza zmienności genetycznej *H. dujardini*, *A. ricciae* oraz *P. rigidus* za pomocą mikromacierzy DNA. Próbkę zostaną pobrane z wszystkich linii występujących w obu eksperymentach w pokoleniu rodzicielskim i pokoleniu 20 (ostatnim).

E. Analizy tempa ewolucji oraz zmian dostosowania we wszystkich grupach obu eksperymentów.

F. Prezentacja oraz publikacja wyników badań.

4. Metodyka badań ■

Prowadzenie hodowli

NIESPORCZAKI. *H. dujardini* będzie hodowany na szalkach Petriego zgodnie z metodą Stec i in. 2015. Obecnie hodowla jest utrzymywana w Instytucie Zoologii i Badań Biomedycznych Uniwersytetu Jagiellońskiego. Hodowle podstawowe prowadzone będą na szlifowanych plastikowych szalkach o średnicy 5 cm, w stałej temperaturze 16 °C, przy stałym uwodnieniu oraz pokarmie podawanym ad libitum. Pokarm stanowić będą dwa jednokomórkowe glonów (*Chlorella sp.*, *Chlorococcum sp.*). Osobniki hodowane będą na medium złożonym ze źródlanej wody „Żywiec” i wody destylowanej w proporcjach objętościowych 1:3, aby zapewnić niesporczakom dostęp do podstawowych składników mineralnych.

Wprowadzenie w stan anhydrobiozy odbywać się będzie poprzez usunięcie niemal całego medium hodowlanego z szalki i pozostawienie jedynie cienkiej warstwy wody na dnie. Następnie szalki zostaną umieszczone w ekcykatorach, gdzie utrzymywana będzie wilgotność powietrza na poziomie 95%. Pozwoli to zapobiec nagłemu wyschnięciu szalki, co jak wykazali Boothby i in. 2017 miałoby negatywny wpływ na prawidłowe wejście w stan anhydrobiozy.

NICIENIE. Organizm zostanie sprowadzony z laboratorium w Stanach Zjednoczonych. Kiedy nie będą wykonywane eksperymenty, hodowla prowadzona będzie w standardowych warunkach laboratoryjnych (20°C, ciemność) na agarozowych szalkach Petriego wysianych bakterią *Escherichia coli* (szczep OP50), która stanowi pokarm dla nicieni. W czasie eksperymentu korzystać będziemy z szalek Petriego wypełnionych pożywką płynną (bufor S wzbogaconym kulturami bakterii OP50).

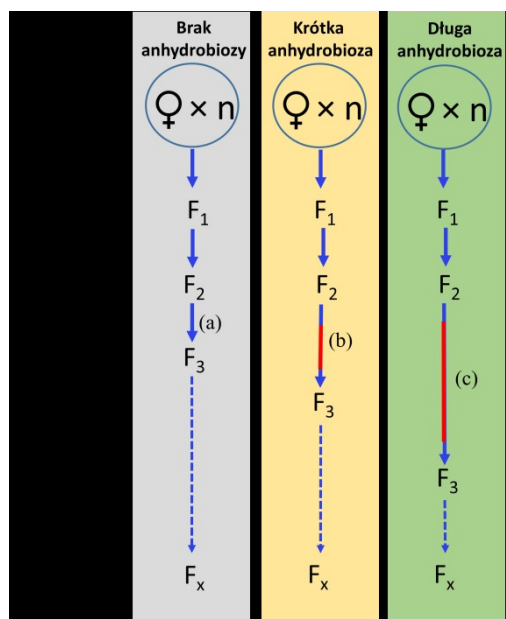
Wprowadzenie w stan anhydrobiozy będzie wykonywane jednokrotnie w każdym pokoleniu według protokołu opisanego przez Ricci i in. 1987 (był używany także w Ricci i Pagani 1997) poprzez odwodnienie nicieni w szalkach Petriego przy użyciu papierowych filtrów nasączonych wodą dejonizowaną. Szalki z odwodnionymi nicieniami będą umieszczone na żelu krzemionkowym. Nawodnienie nicieni będzie następować poprzez dodanie do szalek pożywki płynnej wykorzystywanej do prowadzenia hodowli. Powrót do pełnej mobilności może potrwać kilka godzin, co pokazali Ricci i Pagani 1997.

WROTKI. Gatunek *A. ricciae* sprowadzony zostanie z włoskiego laboratorium (University of Milan). Hodowla klonalnej populacji utrzymywana będzie w 22 °C w pojemnikach wypełnionych wodą destylowaną. Karmione będą codziennie rozdrobnionym pokarmem dla rybek.

Wprowadzenie w stan anhydrobiozy będzie następowało zgodnie z protokołem zamieszczonym w Ricci i in. 2003. Suszenie będzie następowało grupami po 20 osobników przy pomocy papierowego filtra. Gdy nadmiar wody zostanie usunięty szalki Petriego umieszczone zostaną w ekcykatorach, w której ustawiona będzie 97% wilgotność (relative humidity). Po 3 dniach zostanie zmniejszona do 40% i pozostanie taka przez cały okres anhydrobiozy. Wybudzenie będzie następować poprzez dodanie do szalek wody destylowanej.

Eksperyment badający model starzenia „Śpiąca Królowna”

Eksperyment zakłada stworzenie dla każdego z dwóch gatunków 3 grup eksperymentalnych po 10 linii (powtórzeń) w każdej z nich (Ryc.1): (1) grupa kontrolna – bez anhydrobiozy, (2) grupa z krótkimi epizodami anhydrobiozy, (3) grupa z długimi epizodami anhydrobiozy. Wprowadzenie w stan anhydrobiozy będzie wykonywane jednokrotnie w każdym pokoleniu, rozpoczynając od drugiego pokolenia. Każda z linii zostanie utworzona z 200 samic z hodowli podstawowych dla każdego z gatunków osobno. Następnie do kolejnego pokolenia przenoszonych będzie 200 losowo wybranych osobników z pokolenia wcześniejszego. Planowane jest przeprowadzenie ewolucji eksperymentalnej w każdej z grup eksperymentalnych przez 20 pokoleń.



Ekspertyment badający model starzenia „Portret Doriana Graya”

Ekspertyment będzie przeprowadzony według takiego samego schematu, jak ten dotyczący modelu starzenia się „Śpiąca Królowna” za wyjątkiem liczby osobników przynoszonych z pokolenia na pokolenia. W tym przypadku będzie to liczba 10000 osobników. Ewolucja eksperymetalna jest planowana na okres 20 pokoleń.

Pomiary cech historii życiowych oraz określenie zmiany dostosowania

Jako cechy historii życiowych zostaną zmierzone: długość życia, całozyciowa liczba złożonych jaj. Istotne będzie również przetrwanie stanu anhydrobiozy i późniejsza skuteczna regeneracja, ponieważ może się tak zdarzyć, że osobniki mniej przystosowane nie przeżyją (patrz: Ricci i Pagani 1997). Pomiary cech historii życiowych zostaną wykonane dwukrotnie dla osobników każdej z linii – w pokoleniu Fo i w pokoleniu 20 (Ryc. 1). Następnie wyliczona będzie zmiana dostosowania wyrażona w dwóch miarach: długość życia i całozyciowa liczba złożonych jaj. Dwadzieścia samic z każdej linii ze wszystkich grup eksperymetalnych z pokolenia Fo zostanie umieszczonych w indywidualnych dołkach na 24-dołkowych płytkach wypełnionych pożywką. Stan każdej samicy będzie sprawdzany co trzy dni w przypadku niesporczaków i codziennie w przypadku nicieni i wrotków, aż do momentu naturalnej śmierci każdej z nich (np. Kosztyła i in. 2016). Te same pomiary zostaną przeprowadzone dla każdego z modelu starzenia.

Analiza zmienności genetycznej

W związku z czasochłonnością eksperymetalnych ewolucji eksperymetalnej przedstawionej powyżej zdecydowaliśmy się na zlecenie analizy mikromacierzy DNA, która pozwoli na zidentyfikowanie polimorfizmów pojedynczych nukleotydów (SNP) w allelach wewnątrz i między populacjami. Chcąc przeprowadzić ten etap samemu w naszym laboratorium byłibyśmy zmuszeni do zatrudnienia co najmniej jednej osoby w pełnym wymiarze czasu pracy oraz studentów, którzy dostawaliby stypendium. Koszty ich wynagrodzenia byłyby porównywalne z kosztami wykonania tej usługi przez firmę zewnętrzną. Dodatkowo należy pamiętać, że najbardziej czasochłonnym i mogącym nas limitować etapem projektu będzie obróbka danych pochodzących z analizy mikromacierzy DNA. Genomy referencyjne na podstawie, których przygotowano zostaną sondy do amplifikacji fragmentów DNA z regionów kodujących, są obecnie dostępne (Kazuharu i in. 2016, Klage 2008). Planowane jest przeprowadzenie analizy mikromacierzy DNA dla pierwszego i ostatniego pokolenia, w każdym zabiegu, w każdym eksperymencie, w celu zidentyfikowania zmienności w regionach kodujących z użyciem SNP (w sumie 270 populacji). Obróbka otrzymanych z

genotypowania danych będzie przeprowadzona na serwerze Galaxy z wykorzystaniem zaimplementowanych na nim narzędzi do składania, czyszczenia, przeszukiwania i porównywania fragmentów genomów (Afgan i in. 2016). Kolejnym etapem będzie analiza tempa ewolucji poprzez porównanie ilości zmian w genomach na przestrzeni czasu.

Analizy statystyczne

Na podstawie wyników dostosowania pobranych na początku i końcu eksperymentów zostanie wyliczona zmiana dostosowania, która zostanie użyta do wykonania ANOVA, aby porównać grupę kontrolną z grupami o różnej długości anhydrobiozy.

5. Literatura ■

- Ackermann M., Stearns S. C., Jenal U. 2003. *Senescence in a bacterium with asymmetric division*. Science 300: 1920.
- Afgan E., Baker D., van den Beek M., Blankenberg D., Bouvier D., Čech M., Chilton J., Clements D., Coraor N., Eberhard C., Grüning B., Guerler A., Hillman-Jackson J., Von Kuster G., Rasche E., Soranzo N., Turaga N., Taylor J., Nekrutenko A., Goecks J. 2016. *The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2016 update*. Nucleic Acids Research 44: W3-W10.
- Boothby, T.C., Tapia, H., Brozena, A.H., Piszkiwicz, S., Smith, A.E., Giovannini, I., Rebecchi, L., Pielak, G.J., Koshland, D. & Goldstein, B. 2017. *Tardigrades Use Intrinsically Disordered Proteins to Survive Desiccation*. Molecular Cell, 65: 975-984.
- Gensler, H. L., Bernstein, H. 1981. *DNA Damage as the Primary Cause of Aging*. The Quarterly Review of Biology, 56: 279-303.
- Hamilton W. D. 1966. *The moulding of senescence by natural selection*. J Theor Biol 12:12-45.
- Hemann M. T., Greider C. W. 2000. *Wild-derived inbred mouse strains have short telomeres*. Nucleic Acids Research 28: 4474-8.
- Holden C. 2002. *The quest to reverse time's toll*. Science, 295: 1032-1033.
- Hulbert A. J., Pamplona R., Buffenstein R., Buttemer W. A. 2007. *Life and death: metabolic rate, membrane composition, and life span of animals*. Physiol Rev. 87:1175-1213.
- Kirkwood T. B., Austad S. N. 2000. *Why do we age?* Nature 408: 233-238.
- Koszyła, P., Stec, D., Morek, W., Gąsiorek, P., Zawierucha, K., Michno, K., Ufir, K., Małek, D., Hlebowicz, K., Laska, A., Dudziak, M., Frohme, M., Prokop, Z.M., Kaczmarek, Ł. & Michalczyk, Ł. 2016. *Experimental taxonomy confirms the environmental stability of morphometric traits in a taxonomically challenging group of microinvertebrates*. Zoological Journal of the Linnean Society, 178: 765-775.
- Moore-Ede M., Sulzman C., Fuller F. M., Charles A. 1984. *The Clocks that Time Us: Physiology of the Circadian Timing System*. Cambridge, Massachusetts: Harvard University Press. ISBN 0-674-13581-4.
- Pigoń A., Weglarska B. 1953. *The respiration of Tardigrada: a study in animal anabiosis*. Bulletin de l'Academie Polonaise des Sciences. Cl. II 1: 69-72.
- Rensing, L., Meyer-Grahe, U. and Ruoff, P. 2001. *Biological timing and the clock metaphor: oscillatory and hourglass mechanisms*. Chronobiology International, 18: 329-369.
- Ricci C. 1998. *Anhydrobiotic capabilities of bdelloid rotifers*. Hydrobiologia 387/388: 321-326.
- Ricci C., Covino C. 2005. *Anhydrobiosis of Adineta ricciae: Costs and benefits*. Hydrobiologia 546: 307-314.
- Ricci, C., G. Melone, N. Santo & M. Caprioli, 2003. *Morphological response of a Bdelloid rotifer to desiccation*. Journal of Morphology 257: 246-253
- Ricci C., Paganì M. 1997. *Desiccation of Panagrolaimus rigidus (Nematoda): survival, reproduction and the influence on the internal clock*. Hydrobiologia 347: 1-13.
- Ricci C., Fontaneto D. 2009. *The importance of being a bdelloid: Ecological and evolutionary consequences of dormancy*. Italian Journal of Zoology 76: 240-249.
- Ricci C., Vaghi L., Manzini M. L. 1987. *Desiccation of rotifers (Macrotrachela quadricornifera): survival and reproduction*. Ecology 68: 1488-1494.
- Sinclair D., Mills K., Guarente L. 1998. *Aging in Saccharomyces cerevisiae*. Annu Rev Microbiol. 52:533-60.
- Stec, D., Smolak, R., Kaczmarek, Ł., Michalczyk, Ł. 2015. *An integrative description of Macrobiotus paulinae sp. nov. (Tardigrada: Eutardigrada: Macrobiotidae: hufelandi group) from Kenya*. Zootaxa, 4052: 501-526.
- Stewart E. J., Madden R., Paul G., Taddei F. 2005. *Aging and death in an organism that reproduces by morphologically symmetric division*. PLoS Biol. 3: 295-300.

Walford R. L. 1969. *The Immunological Theory of Aging*. Copenhagen: Munksgaard.

Watanabe M. 2006. *Anhydrobiosis in invertebrates*. Appl. Entomol. Zool. 41: 15–31

Wright J. C. 2001. *Cryptobiosis 300 years on from van Leuwenhoek: What have we learned about tardigrades?* Zool. Anz. 240: 563–582.

Kosztorys ■

	2018	2019	2020	Razem
1. Koszty bezpośrednie, wliczając:	360000	176000	160000	696000
1/ Wynagrodzenia	66000	66000	54000	186000
2/ Aparatura	107000	-	-	107000
3/ Inne koszty bezpośrednie	187000	110000	106000	403000
2. Koszty pośrednie	50600	35200	32000	117800
Koszt całkowity (1+2)	410600	211200	192000	813800

Uzasadnienie kosztów ■

Wynagrodzenia: 186 000 PLN

Wynagrodzenie dla kierowników projektu: 1 500 PLN x 12 miesięcy x 3 osoby x 3 lata = 162 000 PLN

Stypendium dla studentów: 1000 PLN x 6 miesięcy x 2 osoby x 2 lata = 24 000 PLN

Specjalistyczna aparatura badawcza: 107 000 PLN

- Autoklaw mikrofalowy: 12 000 PLN
- Komora laminarna: 50 000 PLN
- Pipety automatyczne (2 zestawy pipet jednokanałowych i 2 pipety wielokanałowe): 19 000 PLN
- Zestawy komputerowe + oprogramowanie systemowe i programy bioinformatyczne: 26 000 PLN

Inne koszty bezpośrednie: 403 000 PLN

Utrzymanie hodowli: 150 000 PLN

1. Szkło laboratoryjne (autoklawowalne): 20 000 PLN
(zlewki, cylindry, pipety Pasteura, butelki o różnej pojemności)
2. Plastik laboratoryjny: 80 000 PLN
(plastikowe szalki Petriego, płytki-24 dołkowe, końcówki do pipet automatycznych, probówki Eppendorfa, pudełka na probówki Eppendorfa, butelki)
3. Inne: 50 000 PLN (agar, bakterie, glony, taśma do autoklawu, odczynniki chemiczne do hodowli nicieni, ręczniki papierowe)

Materiały biurowe: 8 000 PLN

(papier i tusz do drukarki, koperty, długopisy, taśma klejąca, koszulki foliowe, segregatory)

Usługi zewnętrzne: 205 000 PLN

1. Analiza mikromacierzy DNA (planowane jest przeprowadzenie analizy mikromacierzy DNA dla pierwszego i ostatniego pokolenia, w każdym zabiegu, w każdym eksperymencie, w celu zidentyfikowania zmienności w regionach kodujących z użyciem SNP, w sumie 270 populacji x ~700 PLN - koszt analizy mikromacierzy DNA dla jednej populacji): 200 000 PLN
2. Transport organizmu modelowego - *Panagrolaimus rigidus* (Nematoda: Panagrolaimidae) ze Stanów Zjednoczonych: 4 500 PLN
3. Transport organizmu modelowego - *Adineta ricciae* (Rotifera: Adineta) z Włoch: 500 zł

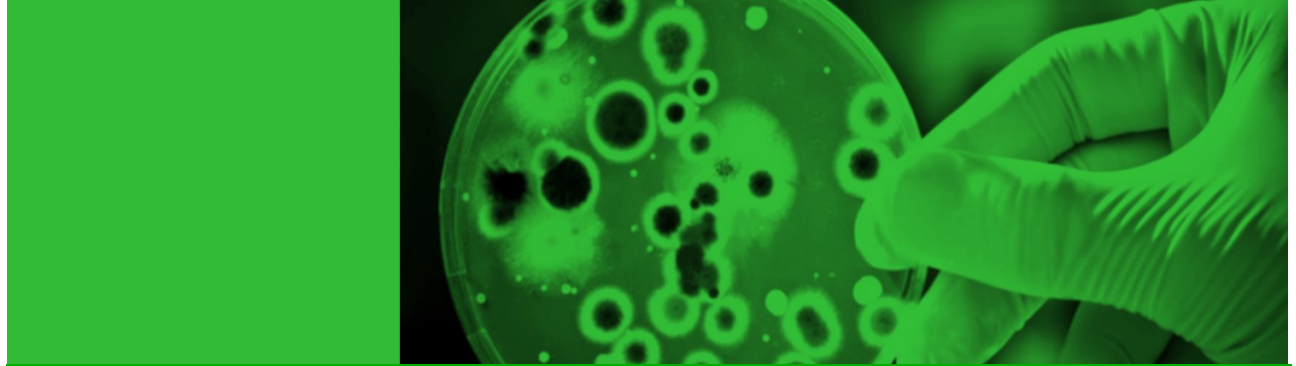
Konferencje: 30 000 PLN

Wyniki projektu będą prezentowane na międzynarodowej konferencji ESEB (Congress of European Society for Evolutionary Biology) (głównie przez kierowników) jak i krajowych PEC (głównie przez studentów, co umożliwi im zdobycie doświadczenia w prezentowaniu wyników). Planowany jest udział w dwóch międzynarodowych i trzech krajowych konferencjach.

Open Access: 10 000 PLN

Niektóre czasopisma z wysokim wskaźnikiem wpływu wymagają opłaty za otwarty dostęp do artykułów. Planowane jest złożenie dwóch publikacji do takich czasopism jak: *Evolution* (IF 4,0) *Journal of Evolutionary Biology* (IF 2,7), *Journal of Experimental Biology* (IF 2,9).





MICROBIOME AS A DRIVING FACTOR OF FEEDING PREFERENCES

PIERWOTNA WERSJA PROJEKTU ■

MICROBIOME OR NUTRIENT DEPRIVATION? DRIVING FACTORS OF FEEDING PREFERENCES

AUTHORS:

Krzysztof Miler, Hanna Tutaj, Katarzyna Woch

PROJECT SUMMARY:

1. Research project objectives / research hypothesis ■

Members of the microbiota (bacterial community inhabiting host organism) require different nutrients to function properly. One can hypothesize that because of their specific food preference, a conflict over resource acquisition may arise within the host system. In that case microbes would be under selective pressure to change the host dietary preference to promote own fitness at the expense of the host interests. There is some evidence which indicates a connection between food preferences and the composition of microbiota, e.g. humans with identical diet differing only in chocolate consumption were shown to differ slightly in microbial metabolites which supposedly feedback on their chocolate preference. More studies of the co-evolution of the microbiota with their hosts are needed, especially in context of microbiota-host conflict.

The main objective of this project is to answer the question: can the microbiome alter host eating behavior to benefit the microbes at the expense of host fitness? We want to achieve this goal by investigating particular microbiota enterotypes influence on feeding preferences of mouse *Mus musculus*. We expect that in this case the host should prefer the food rich in certain nutrients, essential for the survival of given microbiota type. Experiment investigating the effect of microbiota community on feeding preferences will be complemented by another, examining influence of nutritional status after elimination of microbial factor.

2. Research project methodology ■

We will conduct experiments which will allow us to test our two working hypotheses. Our model organism will be a germ-free sterile house mouse *Mus musculus*. In the first study we will obtain 4 groups (25 individuals in each) which will vary in presence of different gut microbial communities (none, *Bacteroides*, *Prevotella* or *Bacteroides* and *Prevotella*). In order to see whether microbiome can manipulate its host's feeding preferences we will expose mice to different food types (which will differ in terms of protein, fat and carbohydrates proportion) and gather data about their preferences. In the second experiment we will also obtain 4 groups (25 individuals in each) which will be treated with different diet (that will differ in protein, fat and carbohydrates proportion). The next step will be to test their food cravings in the same manner as it was done in the first experiment. All of the food given to the animals will be sterilized to exclude possibility of altering microbiota and feces of the mice will be examined to confirm established gut bacterial community.

3. Expected impact of the research project on the development of science, civilization and society ■

Learning the importance of microbiome and its possible impact on feeding behavior will allow us to fill a gap that is present in terms of this issue. Ability of gut microbial community to affect dietary patterns might later on increase susceptibility to diseases connected with pathology of eating. Hence, our results will explain mechanisms causing those diseases and contribute to preventive healthcare. What is more, knowing preferences of particular enterotypes could allow us to change the microbiota gut structure which will change unhealthy eating preferences leading to diseases.

SHORT RESEARCH DESCRIPTION:

1. Project goal ■

Every organism is immersed in its environment and acts as environment for other organisms. Consider an example of microbes residing inside their hosts. These microbes interact with their environment and have profound effects and their hosts (Hooper et al. 2002). Inhabited organisms function in their own environment on which they impose various effects, but they also feedback on microbes residing within them (Ezenwa et al. 2012). This interaction is extensively studied from the perspective of how hosts are affected since it became apparent that the so-called microbiome (microbe diversity inside hosts) has impact on host health (for a recent review see Sánchez et al. 2017). Our knowledge about microbiome significance has raised dramatically in recent decade, especially in the context of human medicine (Thaiss et al. 2016). However, what is lacking is testing this type of relationship from evolutionarily-informed approach (Dittmer et al. 2016). One of the most basic questions that come to mind when thinking about the so-called holobiome (host together with its microbiome) is what kind of interaction is it? In other terms, what are costs and benefits of this type of interaction for both hosts and microbiome? The answer is, of course, extremely complex, as these relationships span from mutualisms to parasitisms depending on context and species involved (Ezenwa et al. 2012). Cases on the extremes of mutualism-parasitism continuum are most interesting and potentially insightful because effects of host-microbiome interrelation are then most pronounced. For example, fruit flies were shown to be manipulated by their own microbiota into mating with individuals with similar microbiota, thus acting in interests of their microbiome to isolate own population (Sharon et al. 2010). Here, we are interested in the parasitic end of this continuum too, and further, on the perspective of host behavior being tightly linked to the presence of microbiome and its characteristics. It can be hypothesized that in conditions of co-evolution between parties involved in the holobiome, host behavior becomes inextricably linked to the fitness interests of its microbiome (Norris et al. 2013). This is evident when considering e.g. the role of microbiome for physiological, behavioral and evolutionary processes in various insects (extensively studied group in this context), where some of the most spectacular examples of host manipulation by microbiome can be found (Lewis and Lize 2015). Here, we hypothesize that fitness interests of the microbiome may not align with host fitness interests, thus creating conflict in which microbiome may evolve adaptations to force hosts to behave in a certain way, serving their interests in terms of substrate delivery (feeding preferences). To test this hypothesis, we want to perform an experiment using a mouse model (*Mus musculus*) in which we want to manipulate host microbiome composition and investigate between-group differences in consumption of different types of food. We expect that food preferences should be evident only in case of groups with certain microbiota which show interests that are known to not align with host interests. If our prediction will be confirmed, then we will show evidence of host behavioral manipulation by microbiome. Further, we want to perform another, similar experiment, in which we will explore possible role of nutrient deprivation as a driving force of feeding preferences, and to some extent compare impact of these two factors (microbiome vs. nutrient deprivation).

2. Project significance ■

Selection pressures among participants of the holobiome go both ways when co-evolution between involved parties occurs (Norris et al. 2013; Dittmer et al. 2016). Based on various interdependent features of hosts and their microbiome, adaptations and counteradaptations can be presumed to form. Indeed, it is now acknowledged that microbiome characteristics correlate with various traits of their hosts, especially in context of health and disease (Thaiss et al. 2016). However, our gap in knowledge in terms of this issue is vast (Ezenwa et al. 2016). When this project will be completed, this will be novel and important study on the

issue, performed from the perspective of conflicting microbiome and host interests. Our overarching goal is to determine the importance of microbiome for food preferences on an example of mice (*Mus musculus*), which is a model organism. Thus, our results will not only give us answers to important questions regarding nutritional decisions but also broaden our understanding of model species used in research. We expect our results to be of broad interest and thus publishable in high impact factor journals.

3. Research plan ■

In our research we will test two hypotheses. The first one states that gut microbiome influences host feeding preferences whereas the second one asserts that particular food cravings are due to nutrient deprivation. In two consecutive experiments in which we will (I) manipulate diversity of bacterial community and (II) manipulate nutritional status in our study organism, we will assay what are its dietary patterns, enabling us to differentiate between our hypotheses. Ethics Committee opinion will be obtained before project starting in order to follow all institutional and national guidelines for the care and use of laboratory animals in force in Poland, the country in which research will be conducted. After obtaining all permits, we will proceed to the first experiment testing whether microbiota may affect food preferences of mice and then proceed to the second experiment testing whether dietary status may affect food preferences of mice. In the first experiment, germ-free mice which lack intestinal microbiota will be obtained and kept in laboratory sterile conditions to acclimatize. Then their microbiota will be manipulated to create four different groups of mice: (1) germ-free with control null enterotype showing no preferences in diet, (2) *Bacteroides* enterotype representing microbiota with preference for high fat and protein diet, (3) *Prevotella* enterotype as microbiota with high preference for carbohydrate-rich diet, and (4) *Bacteroides* and *Prevotella* enterotype imitating preference for all types of previously mentioned nutritional substances. Relationship between each enterotype and possible food cravings are supported by the literature (Wu et al. 2011). The fitness interest among different microbiome composing species do not have to be unified because different types of microbes compete over available nutrients and habitats. The more diverse the microbiota, the less pressure should be put on a host, as more resources will be used on intra-microbiomic competition. Less diverse populations consisting of species with large population sizes and more resources available should have more power to manipulate host behavior, e.g. through more easily established quorum (Dethlefsen et al. 2007; Lozupone et al. 2012; Rutherford and Bassler 2012). After establishing the four groups, a cafeteria experiment will be conducted with mice choosing food differing in protein:fat:carbohydrates ratio. Based on the amount of consumed food of each type in each group, food preferences can be specified and then compared between enterotypes. This comparison should determine whether microbiome manipulates its host to choose food that microbiome prefers. The second experiment will allow us to test the hypothesis that nutrient shortage results in altered food preferences as, for instance, in case of fruit flies showing preference for particular nutrients after their deprivation (Gough 2010). In this experiment, we will expose mice belonging to four different groups to single type of diet lacking sufficient intake of a particular nutrient: (1) carbohydrates, (2) protein, (3) fat, or (4) none (standard, fully nutritional food with carbohydrates:protein:fat ratio 1:1:1) in order to differently change the nutritional status of the animals belonging to different groups. After a weeklong acclimatization period a cafeteria experiment will be performed as in the first part of the project. Based on the amount of consumed food of each type in each group, food preferences can be specified and then compared between groups differing in nutritional status. This comparison should determine whether host chooses food based on its own motivational state stemming from nutritional status. Animals after both experiments will be euthanized.

4. Methodology ■

In the first experiment, we will use 100 male germ-free six-week-old mice from Charles River colonies (ANAXEM, France). After transportation to the laboratory animals will be kept separately in small germ-free isolators (Igenia, France) with ad libitum autoclaved deionized water and irradiated diet (Research Diet Inc., USA) delivered on three dishes placed on a tray rotating automatically by 90° every hour. This diet will contain 1:1:1 proportion of protein:fat:carbohydrates. Animals will be left for a week to allow acclimatization to these laboratory conditions. Water and food will be switched for fresh ones each day. Lack of bacterial communities in mice will be confirmed with daily feces analysis (described below). After acclimatization, animals will be divided into four groups and the experiment will begin. Groups will be treated differently in terms of their acquired microbiota. First group, control, will receive pure autoclaved saline into their water

supply. Other three groups will receive pure autoclaved saline cocktails with bacterial strains into their water supply in order to establish groups differing in enterotypes (microbiome presence). Cocktails will contain *Bacteroides*, *Prevotella* or *Bacteroides* and *Prevotella* strains for second, third and fourth group. This will result in obtaining four groups with different enterotypes: first with null enterotype, second with *Bacteroides* enterotype, third with *Prevotella* enterotype, and fourth with mixed enterotype. Cocktails will be prepared with standard method: cultures of *Bacteroides* and *Prevotella* will be brought (ATCC, USA) and transported to the laboratory where they will be grown anaerobically (37°C, 5% CO) in MRS broth (Sigma-Aldrich, USA) prior to the experiment; prepared pellets will be harvested and diluted with pure autoclaved saline (Sigma-Aldrich, USA) to desired dose of 1×10^2 CFU (in case of fourth group, proportion of *Bacteroides*:*Prevotella* strains will be 1:1, 1×10 CFU each). The 1×10 CFU dose should be effective for colonization. Water supply for each group will be switched for fresh one on each day for two weeks during which saline alone or saline cocktails will be administered. This time should be effective for enterotype establishing. During this time feces will be collected each day for analysis confirming enterotypes (described below). Afterwards, a cafeteria experiment will be conducted. During the experiment, ad libitum autoclaved deionized water supply will be provided for each group, which will receive different types of food they will be allowed to choose from (Research Diet Inc., USA). Food will be irradiated and delivered ad libitum on a tripartite tray rotating automatically by 90° every hour, with three dishes containing food, as before. In terms of protein:fat:carbohydrates proportion, first dish will be characterized by 0:0:1 ratio, second dish with 0:1:0 ratio and third dish with 1:0:0 ratio. Food amount of each type will be fixed and we will measure its mass after a day to determine how much was consumed and thus what the food preference is. Results will be analyzed with fixed one-factor analysis of variance in R software.

Daily feces analysis for sterility confirmation and enterotype establishing confirmation will be done in order to exclude individuals which became contaminated and which failed to establish desired enterotype. Feces samples will be frozen at -80°C each day immediately after collection. After the end of the cafeteria experiment microbiome DNA from each sample will be extracted using FastDNA™ 50 mL SPIN Kit for Soil (MP Biomedicals, USA). Microbial community profiles confirming enterotypes will be obtained by sequencing of 16S ribosomal DNA (rDNA). Library will be prepared with Nextera XT v2 Index Kit (Illumina Inc., USA). Sequencing will be performed on the Illumina MiSeq platform (MiSeq Reagent Kit v.2, 500 cycles) according to the manufacturer's specifications generating paired-end reads of 300 bases length in each direction. Data analysis and interpretation will be performed using 16S Metagenomics workflow (Miseq Reporter software, Illumina Inc.).

Second experiment will be conducted on another 100 male germ-free mice of the same origin and in the same age. In the laboratory, animals will be kept in the same manner as in the first experiment. Mice will be randomly divided into four groups and then each group will receive different diet resulting in different nutritional status. First (control) group will be fed with food containing 1:1:1 proportion of protein:fat:carbohydrates, second will be treated with 0.25:0.25:1 ratio, third with 0.25:1:0.25 ratio and fourth with 1:0.25:0.25 ratio. Delivered food will be irradiated whereas water will be autoclaved and deionized, both available ad libitum. Animals will be left for a week to allow acclimatization to laboratory conditions and stabilize nutrient deprivation. Water and food will be replaced each day. After acclimatization, a cafeteria experiment will be conducted as in the first experiment. Same type of data will be gathered and the analyzed analogically.

Experimental protocol for this project is based on methods previously used on mice studied in the context of their microbiota (Duca et al. 2012; Zavisic et al. 2012; Jeong et al. 2017; Pazzini et al. 2017). We acknowledge that conducting research on germ-free mice can be viewed as ecologically incorrect, but we want to note that this project is only a first inquiry into the presented issues, and furthermore, germ-free animals are often used to address questions related to microbiota (Al-Asmakh and Zadjali 2015).

Experiments will be conducted in Ośrodek Medycyny Eksperymentalnej i Innowacyjnej in Kraków (OMEII) as this institution has all the required equipment and conditions to conduct this research. Genetic analyses will be conducted in Uniwersytet Jagielloński in Kraków where researchers are stationed and all the required equipment and conditions are available.

5. Literature ■

- Al-Asmakh and Zadjali 2015** Use of germ-free animal models in microbiota-related research. *J Microbiol Biotechnol* 25, 1583-1588.
- Dethlefsen, McFall-Ngai and Relman 2007** An ecological and evolutionary perspective on human-microbe mutualism and disease. *Nature* 449, 811-818.
- Dittmer, van Opstal, Shropshire, Bordenstein, Hurst and Brucker 2016** Disentangling a holobiont – recent advances and perspectives in *Nasonia* wasps. *Front Micro* 7, 1478.
- Duca, Swartz, Sakar and Covasa 2012** Increased oral detection, but decreased intestinal signaling for fats in mice lacking gut microbiota. *PLoS ONE* 7, e39748.
- Ezenwa, Gerardo, Inouye, Medina and Xavier 2012** Animal behavior and the microbiome. *Science* 338, 198-199.
- Ezenwa, Archie, Craft, Hawley, Martin, Moore and White 2016** Host behaviour-parasite feedback: an essential link between animal behaviour and disease ecology. *Proc R Soc B* 283, 20153078.
- Gough 2010** Even flies have cravings. *Sci Sign* 3, ec178.
- Hooper, Midtvedt and Gordon 2002** How host-microbial interactions shape the nutrient environment of the mammalian intestine. *Annu Rev Nutr* 22, 283-307.
- Jeong, Kim, Kang, Kim, Song, Kim and Seo 2017** Modulation of gut microbiota and increase in fecal water content in mice induced by administration of *Lactobacillus kefirifaciens* DN1. *Food Funct* 8, 680.
- Lewis and Lize 2015** Insect behaviour and the microbiome. *Curr Opin Ins Sci* 9, 86-90.
- Lozupone, Stombaugh, Gordon, Jansson and Knight 2012** Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature* 289, 220-230.
- Norris, Molina and Gewirtz 2013** Bacteria control host appetites. *J Bact* 195, 411-416.
- Pazzini, Pereira, Aparecida de Silva, Montalvany-Antonucci, Macari, Marques and de Paiva 2017** Probiotic consumption decreases the number of osteoclasts during orthodontic movement in mice. *Arch Oral Biol* 79, 30-34.
- Rutherford and Bassler 2012** Bacterial quorum sensing: its role in virulence and possibilities for its control. *Cold Spring Harb Med* 2, a012427.
- Sánchez, Delgado, Blanco-Míguez, Lourenço, Gueimonde and Margolles 2017** Probiotics, gut microbiota, and their influence on host health and disease. *Mol Nutr Food Res* 61, 1600240.
- Sharon, Segal, Ringo, Hefetz, Zilber-Rosenberg and Rosenberg 2010** Commensal bacteria play a role in mating preference of *Drosophila melanogaster*. *PNAS* 107, 20051-20056.
- Thaiss, Zmora, Levy and Elinav 2016** The microbiome and innate immunity. *Nature* 535, 65-74.
- Wu, Chen, Hoffmann, Bittinger, Chen, Keilbaugh, Bawtra, Knights, Walters, Knight, Sinha, Gilroy, Gupta, Baldassano, Nessel, Li, Bushman and Lewis 2011** Gut microbial enterotypes. *Science* 334, 105-108.
- Zavistic, Petricevic, Radulovic, Begovic, Golic, Tipisirovic and Strahinic 2012** Probiotic features of two oral *Lactobacillus* isolates. *Brazil J Microbiol* 43, 418-428.

Costs ■

Item	Funds for each budget year (PLN)		
	2018	2019	Total
– Direct costs			
– salaries and benefits	40000	36000	76000
– equipment	15000		15000
– other direct costs	170000	40000	210000
– Indirect costs	42000	15200	57200
– Total costs	267000	91200	346200

Justification of costs ■

Direct costs

- salaries and benefits (76000 PLN in total): 36000 PLN per year for three researchers to finish the proposed project (1000 PLN per month per researcher), 4000 PLN for an engineer to design and prepare the electronic tray for cafeteria parts of the project (compatible with equipment for sterile

- maintenance of mice in OMEII);
5. equipment (15000 PLN in total): laptop for each researcher, for data analysis and manuscript writing (5000 PLN per laptop per researcher);
 6. other direct costs (210 000 PLN in total): 120 000 PLN for analysis of sterility confirmation and enterotype establishing confirmation (reagents and kits), 20 000 PLN for bacteria-related costs (buffers, dishes, cultures), 10 000 PLN for externally obtained specialized food supply, 20 000 PLN for cooperation costs with OMEII, 20 000 PLN for open access publication and linguistic correction of manuscript, 20 000 PLN for conference attendance.

RECENZJE ■

prof. dr hab. Mariusz Cichoń:

Bardzo interesujący projekt mający na celu sprawdzenie na ile bakterie zasiedlające przewód pokarmowy, a na ile ograniczenia w dostępie do konkretnych nutrientów są odpowiedzialne za preferencje pokarmowe u myszy. Godne podkreślenia jest eksperymentalne podejście z użyciem myszy pozbawionych flory bakteryjnej w ich przewodach pokarmowych. Jedynym potencjalnym mankamentem może być brak rozpatrywania możliwości, że preferencje pokarmowe mogą być efektem interakcji między potrzebami bakterii, a potrzebami gospodarza. Projekt jest także obciążony dość sporym ryzykiem związanym z utrzymaniem sterylności. Plan badań i metodologia są dobrze opisane, ale nie wiem skąd biorą się konkretne proporcje białka, tłuszczu i cukrów w pokarmie. Czy myszy mają właśnie takie preferencje, moim zdaniem to nieintuicyjne, ale mogę się mylić. Nie bardzo wiem także jakie dane będą wynikiem tego projektu. Jaka będzie ich struktura i jak zostaną zanalizowane. Stwierdzenie, że będzie to jednoczynnikowa analiza wariancji jest zdecydowanie zbyt ogólne jeśli nie wiemy co będzie zmienną zależną. Czy poza grupami eksperymentalnymi nie będzie żadnych innych czynników wziętych do tej analizy? To są dość podstawowe informacje, ważniejsze niż stwierdzenie, że analiza będzie wykonana w R software, szczególnie, że tak prosta analiza może być wykonana przy użyciu kalkulatora, czy Excela. Dobrze byłoby także wskazać jakie są oczekiwane wyniki i gdzie autorzy zamierzają je opublikować. Stwierdzenie, że w dobrych indeksowanych zagranicznych czasopiśmie mało informuje o tym, czy autorzy przewidują potencjał swojego przyszłego osiągnięcia ■

Ewa Bobulska:

Projekt został napisany w sposób prawidłowy, jego poszczególne części składają się w spójną całość. Badania mają charakter badań podstawowych, a zaproponowany przez autorów kierunek prac badawczych pozwoli odpowiedzieć na ważne pytania, jak i uzupełnić luki w wiedzy. Przedstawiona w projekcie literatura wydaje się to potwierdzać. Autorzy zamierzają przetestować (chyba) dwie hipotezy badawcze, w tym celu zaplanowali szczegółowo dwa eksperymenty, które mają im to umożliwić. Natomiast dostrzegam pewną niespójność w liczbie pytań badawczych, przedstawionych w opisie projektu, a liczbie hipotez w części metodologicznej – czy autorzy będą badać dwie, czy trzy hipotezy? Jest to dla mnie nie do końca jasne.

Moje zastrzeżenia wzbudza łatwość przejścia od zagadnienia wpływu mikrobiomu na zdrowie człowieka, do badań na modelu mysim. Co za tym idzie, możliwe, że znaczenie wyników projektu dla rozwoju cywilizacyjnego należałoby inaczej uzasadnić.

Nie jest też dla mnie jasne, dlaczego autorzy zamierzają procować tylko na myszach jednej płci. Moim zdaniem może to zaburzyć wyniki i badania należałoby przeprowadzić zarówno na samcach, jak i samicach. Możliwe, że ma to naukowe uzasadnienie, natomiast ja w opisie projektu się go nie doszukałam.

Warto jednak zwrócić uwagę na wiedzę autorów, jak i zainteresowanie prezentowaną dziedziną, które doskonale rokują na rzetelność przeprowadzenia proponowanych badań.

Ocena kosztorysu

Kosztorys wydaje się dobrze przemyślany, a jego poszczególne elementy uzasadnione. Duża kwota na analizę sterylności wyróżnia się na tle innych wydatków, ale zakładam, że autorzy jako specjaliści z danej dziedziny sprawdzili, że nie da się tego wykonać mniejszym nakładem środków. Wynagrodzenie dla wykonawców projektu jest stosunkowo niewielkie, zastanawia mnie jedynie, czy zakup trzech laptopów jest w pełni uzasadniony.

Ocena możliwości wykonania

Uważam, że projekt jest możliwy do wykonania, a otrzymane wyniki mogą okazać się nie tylko interesujące, ale i pod pewnymi względami przełomowe. Dlatego proponowałabym autorom projektu, żeby już na tym etapie pisania wniosku zastanowili się gdzie chcieliby opublikować wyniki planowanych badań oraz na jakich konferencjach zamierzają je przedstawiać. Badana tematyka może spotkać się z zainteresowaniem szerszej grupy odbiorców, gdyby przedstawić otrzymane wyniki w formie popularna naukowej. Warto by autorzy o tym również pomyśleli. Chciałabym jednak zachęcić autorów do ponownej analizy postawionych hipotez i pytań badawczych i jasnego wyartykułowania, czy będą testować dwie, czy trzy hipotezy. Należałoby również wyjaśnić kwestie związane z wyborem konkretnej płci modelowego gatunku.

Mocne strony wniosku

- ciekawy pomysł,
- istotność problemu (tematyka, która wzbudza obecnie duże zainteresowanie),
- przemyślany plan badań;

Słabe strony wniosku

- niespójność w ilości przedstawionych hipotez /pytań badawczych,
- drobne niejasności metodologiczne – brak uzasadnienia wyboru konkretnej płci modelowego gatunku,
- nie zaplanowano ewentualnego miejsca publikacji wyników, jak i konferencji naukowych ■

Agnieszka Janas:

Ocena merytoryczna projektu

Niniejszy projekt badający wpływ mikrobiomu jelitowego na preferencje żywieniowe gospodarza spełnia kryterium badań podstawowych. Tematyka jest niezwykle interesująca szczególnie ze względu na fakt, że poświęca uwagę kwestii koewolucji mikroorganizmów z gospodarzem oraz możliwym konflikcie interesów w tej wzajemnej relacji. Pomimo bazowania na znanych modelach eksperymentalnych, w świetle opisanych ekologicznych zależności uważam, że praca jest w pełni nowatorka. Wniosek został przygotowany starannie, ponadto autorzy duży trud włożyli w przygotowanie projektu w języku obcym i należy tutaj podkreślić, że efekt jest zadowalający. Weryfikacja dwóch głównych hipotez postawionych przez autorów dostarczy informacji znaczących dla rozwoju dziedziny badawczej, jak również może mieć wpływ na rozwój medycyny, na co zwracają uwagę autorzy projektu. Niemniej jednak mam wątpliwości czy badanie na modelu myszy może być na tyle miarodajne, by na ich podstawie wyciągać wnioski w odniesieniu do organizmu człowieka. Czy w tym przypadku problem nie jest znacznie bardziej złożony. Wątpliwości budzi również wyróżnienie w pierwszym doświadczeniu czterech grup myszy ze względu na rodzaj bakterii zasiedlających ich przewód pokarmowy. Czy ewentualne wyeliminowanie grupy myszy, których jelita skolonizowane są przez mikrobiom reprezentujący rodzaje *Prevotella* i *Bacteroides*, nie uprościłoby przedstawionego modelu eksperymentu i nie zmniejszyłoby kosztów. Taką możliwość myślę, że warto poddać pod dyskusję.

Ocena kosztorysu

Kosztorys jest przygotowany prawidłowo, w sposób klarowny, aczkolwiek konieczne jest ponowne

zweryfikowanie kosztów podanych w tabeli, gdyż doszukać się w niej można błędów obliczeniowych. Uzasadnienie kosztów jest satysfakcjonujące.

Ocena możliwości wykonania

Sukces opisanego eksperymentu jest potencjalnie możliwy. Jednakże rozważyłabym zaangażowanie większej liczby osób, które wykonywałyby opisane w projekcie pomiary i analizy w odniesieniu do każdej myszy z osobna, w trakcie trwania doświadczenia.

Mocne strony wniosku

- doświadczenie bardzo dobrze przemyślane,
- pomysł projektu nowatorski w świetle dotychczasowych badań nad mikrobiomem,
- wskazanie na wątpliwości dotyczące interpretacji z ekologicznego punktu widzenia, z równoczesnym uzasadnieniem wyboru rozwiązania opisanego problemu badawczego,
- bogata literatura;

Słabe strony wniosku

- niewystarczające uzasadnienie słuszności odnoszenia uzyskanych wyników do potencjalnie możliwych analogii występujących u człowieka,
- obecność błędów w składni zdań ■

Daniel Stec:

Autorzy projektu podejmują się wziętego i popularnego tematu dotyczącego czynników wpływających na preferencje pokarmowe. Chcą wyjaśnić jak obecność oraz rodzaj mikrobiomu zasiedlającego przewód pokarmowy kształtuje zachowania związane z żywieniem się. Pomimo, że ostatnimi czasy stan wiedzy na temat mikrobiomu i jego interakcji z gospodarzem znacząco wzrósł nadal wiele kwestii ewolucyjnych o tym związku pozostaje niejasnych bądź nierozwiązanych. W przedstawionym projekcie autorzy w celu przetestowania postawionych hipotez badawczych będą wykorzystywać sterylne szczep myszy, jako organizm modelowy. U zwierząt dokonana zostanie manipulacja składem mikrobiomu gospodarza a następnie sprawdzone zostanie czy ma to wpływ na różnicę w ilości spożywanego typu zadanego pokarmu. Wyniki z realizacji projektu mogą mieć duże znaczenie dla dokładniejszego wyjaśnienia mechanizmu podejmowania decyzji żywieniowych oraz lepszego scharakteryzowania dyskutowanej interakcji, co przełoży jest niezwykle ważne w kontekście zdrowia i chorób związanych z odżywianiem.

Jednakże, kilka kwestii przedstawionych w projekcie pozostaje niejasnych i mogłyby one być uznane za gorsze strony projektu. Poniżej zostały one wylistowane i opatrzone komentarzem.

- W projekcie planowane jest użycie 200 myszy (po 100 na każdy dwóch przedstawionych eksperymentów), jednakże liczba ta nie została nigdzie umotywowana. Wydaje się być to niepokojące zważywszy na fakt, że wykorzystanie zwierząt kręgowych do eksperymentów budzi obecnie wiele kontrowersji i jest ściśle regulowane przez akty prawne i komisje bioetyczne. Brak dokładnego wyjaśnienia, dlaczego zamierza się użyć takiej a nie innej liczby osobników może przyczynić się do obniżonej oceny wniosku.
- W projekcie używane będą myszy sześciotygodniowe, które po tygodniu aklimatyzacji i przygotowań zostaną poddane zabiegom eksperymentalnym. Tematyka projektu dotyczy preferencji pokarmowych a autorzy projektu nigdzie nie przedstawiają i nie tłumaczą, dlaczego używają myszy sześciotygodniowych tygodniowych. U myszy będących ssakami w ciągu życia zachodzi zmiana w sposobie odżywiania się (z pokarmu matczynego - mleko na pokarm stały), co może mieć też znaczenie dla realizacji projektu. Dodatkowo wraz z wiekiem profil hormonalny organizmu może ulegać zmianie i to również może być czynnikiem, który nie został uwzględniony w eksperymencie. Ponadto w projekcie używane będą tylko samce, co spowoduje możliwość ograniczonego wnioskowania. Autorzy nie komentują i nie wyjaśniają tego faktu, dlatego też wyniki projektu nie mogą być zbyt uogólniane.

- W eksperymencie mającym na celu przetestowanie jak niedobór określonych składników pokarmowych może wpływać na zachowania żywieniowe autorzy chcą użyć myszy z wywołanym przez nich niedoborem. W tym celu przez 6 tygodni zamierzają podawać sterylnym myszom pokarm o różnym stosunku składników pokarmowych ad libitum (różny stosunek skł. pokarmowych w zależności o planowanego zabiegu). Rodzą się tutaj dwie niepewności. Skąd wiadomo, że tydzień wystarczy aby wywołać niedobór danego składnika pokarmowego? Drugą natomiast jest podawanie pokarmu ad libitum. Łatwo jest sobie wyobrazić, że osobniki odczuwające brak jakiegoś składnika będą pobierały więcej jedzenia niż powinny w prawidłowych warunkach. Rozwiązaniem tego problemu może być zupełne wyeliminowanie z diety danego składnika pokarmowego bądź dostarczanie jedynie niezbędnych dawek zbilansowanego pokarmu o zaplanowanym stosunku składników pokarmowych.
- Zdanie „Experimental protocol for this project is based on methods previously used on mice studied in the context of their microbiota (Duca et al. 2012; Zavisic et al. 2012; Jeong et al. 2017; Pazzini et al. 2017)”, uważam za zbyt ogólne. W projekcie tak naprawdę planowane jest użycie kilku różnych protokołów (hodowla mysz, hodowla bakterii, sekwencjonowanie NGS, przechowywanie prób, wreszcie same protokoły dwóch głównych eksperymentów), przez co takie sformułowanie sugeruje jakoby bardzo podobne badania zostały już wykonane.

Streszczenie projektu zawiera wszystkie ważne informacje, które powinny się w nim znaleźć. Osadzenie projektu w dotychczasowej wiedzy a także przedstawienie założeń/celów projektu jest jasne i w zupełności wystarczające. Skrócony opis metodologii stosowanej w projekcie także wyczerpuje temat jak na tą część wniosku projektowego, jest jasny i zrozumiały dla czytelnika. Jednakże, jako że badania podstawowe są finansowane z pieniędzy pochodzących od podatników, którzy liczą na korzyści z tego celu, to ostatnia część streszczenia wydaje się być nieco uboga.

W przedstawionym kosztorysie można dostrzec kilka niepewności. Pierwszą wątpliwość budzi koszt wynajęcia pomieszczeń i sprzętu w Ośrodku Medycyny Eksperymentalnej i Innowacyjnej w Krakowie. Wynikać to może ze zbyt ogólnego przedstawienia, co tak naprawdę zawiera się w tym koszcie. Dużym błędem jest nieuwzględnienie w kosztorysie kosztu, jaki autorzy projektu powinni ponieść za zakupienie jałowych myszy. Jeśli nawet miałoby je dostać w prezencie to powinno być to jasno określone w projekcie, gdyż koszt wyhodowania tak wyjątkowych osobników z całą pewnością jest niebanalny ■

Paulina Wietrzyk:

Ocena merytoryczna projektu

Projekt ma na celu udzielenie odpowiedzi na pytanie czy istnieje konflikt preferencji pokarmowych pomiędzy gospodarza a zasiedlającym go mikrobiomem. Autorzy zaznaczają, że w wyniku koewolucji, mikrobiom mógł wykształcić mechanizmy zmieniające preferencje pokarmowe gospodarza w zależności od zapotrzebowania odżywczego mikroorganizmów. Jednocześnie zwracają uwagę na dotychczasowy brak naukowych badań tego zjawiska.

Projekt został przygotowany bardzo rzetelnie. Spełnia on założenie badań podstawowych oraz ma charakter naukowy. Zaproponowane zostały dwa eksperymenty badawcze wykorzystujące jako organizm modelowy mysz (*Mus musculus*) wyjąłową pod względem bakterii występujących w przewodzie pokarmowym. Oba eksperymenty zostały szczegółowo zaplanowane i wydają się być adekwatne do weryfikacji postawionych hipotezy przewidywań.

Ważnym jest, że autorzy zakładają publikację swoich wyników w czasopiśmie w systemie Open Access znajdujących się na liście Journal Citation Reports. Uważam, że z uwagi na niezwykle interesującą tematykę projektu, wyniki mają szansę na publikację w czasopiśmie z listy JCR, dlatego poziom naukowy badań można uznać za bardzo dobry. Warto zaznaczyć, że wyniki uzyskane po zakończeniu projektu mogą stanowić punkt wyjścia do dalszych badań i przyczynić się do poprawy diagnostyki i leczenia chorób układu pokarmowego.

Ocena kosztorysu

Wydatki zawarte w kosztorysie wydają się być zasadne. Autorzy dość szczegółowo opisali uzasadnienie poszczególnych kosztów. Należy jednak ponownie przeliczyć kosztorys głównie pod względem wartości całkowitego kosztu projektu. W kosztorysie nie uwzględniono kosztów zakupu i transportu osobników myszy do przeprowadzenia eksperymentów. Brakuje także sumy kosztów bezpośrednich dla poszczególnych lat.

Ocena możliwości wykonania

Metody badawcze prezentowane w projekcie są dobrze zaplanowane przez co projekt jest możliwy do zrealizowania. Autorzy nie określili jednak potencjalnego obszaru ryzyka oraz zabezpieczeń w trakcie komplikacji projektu przykładowo w aspekcie terminowości wykonania eksperymentów w momencie wystąpienia konieczności eliminacji z doświadczenia osobników zakażonych niepożądanymi bakteriami.

Mocne strony wniosku

- temat projektu – ciekawy i ważny pod względem diagnostyki i leczenia chorób układu pokarmowego,
- projekt uzupełnia luki w obecnym stanie wiedzy,
- dobrze zaprojektowane eksperymenty badawcze,
- plan publikacji wyników w czasopismach z listy JCR w systemie Open Access;

Słabe strony wniosku

- błędy w kosztorysie,
- brak określenia obszaru ryzyka;

Ocena ogólna projektu

Podsumowując powyższą recenzję, uważam że projekt wymaga jedynie drobnej korekty i wart jest realizacji. Wyniki projektu, nie tylko uzupełniają brakującą lukę w światowej wiedzy, ale również przysłużą się do udoskonalenia diagnostyki i leczenia chorób układu pokarmowego ■

Kamila Zając:

Prezentowany projekt „Microbiome or nutrient deprivation? Driving factors of feeding preferences” oceniam jako bardzo dobry, realizacja badań dostarczy kluczowych odpowiedzi na temat czynników warunkujących preferencje pokarmowe. Badacze podczas trwania projektu będą sprawdzać, jak obecność i rodzaj mikrobiomu wpływa na zachowania związane z żywieniem.

Wnioskodawcy wykazali się bardzo dobrą znajomością literatury, co świadczy o poznaniu zgłębianego tematu. Mocną stroną wniosku jest odwołanie się do najnowszych publikacji z okresu ostatnich 10 lat, co pokazuje, że wnioskodawcy zauważają, gdzie znajdują się luki w wiedzy i proponują eksperymenty, które mogą dostarczyć oryginalnych danych na temat wpływu czynników na preferencje pokarmowe. W prezentowanym wniosku jasno zostały przedstawione stawiane cele naukowe oraz testowane hipotezy badawcze. Na szczególne wyróżnienie zasługuje nowatorski charakter badań, których wyniki dostarczą informacji mogących mieć wpływ na rozwój nauki, cywilizacji i społeczeństwa, nie tylko ze względu na uzyskanie nowych, oryginalnych danych, ale także znaczenia wyników w obszarze zdrowia i chorób związanych z odżywianiem. Ponadto wyniki z łatwością będą mogły być opublikowane w impaktowanych czasopismach głównego nurtu dla danej dziedziny znajdujących się na liście filadelfijskiej.

Ocena kosztorysu

Wnioskodawcy przygotowali kosztorys w sposób jasny i przejrzysty. Klarownie wyjaśnili na co zostaną wydane otrzymane środki finansowe podczas realizacji projektu. Słabą stroną kosztorysu jest nieuwzględnienie kosztu zakupu myszy, nawet jeśli wnioskodawcy nie planują zakupu modeli badawczych, tylko pozyskują je za darmo, powinno zostać to napisane w uzasadnieniu poniesionych kosztów.

Ocena możliwości wykonania

Uważam, że prezentowany projekt ma duży potencjał i z dużym powodzeniem może zostać zrealizowany. Wnioskodawcy w klarowny sposób przedstawili w jaki sposób będą prowadzone badania, szczegółowo opisali metodykę. Wyniki będą mogły zostać zaprezentowane podczas prestiżowych konferencji międzynarodowych oraz specjalistycznych. Wyczerpujący plan eksperymentów oraz prezentowana metodyka świadczą o tym, że młodzi badacze mają wiedzę konieczną do wykonania projektu i jego właściwej realizacji.

Mocne strony wniosku

- jasny i przejrzyste przygotowany kosztorys,
- jasno sprecyzowany cel projektu, hipotezy badawcze,
- mocną stroną wniosku jest również potencjalne znaczenie otrzymanych wyników na rozwój nauki, cywilizacji i społeczeństwa w kontekście zdrowia i chorób związanych z odżywianiem,
- projekt przygotowany w oparciu o najnowsze dane literaturowe,
- szczegółowo opisana metodologia;

Słabe strony wniosku

Niektóre elementy we wniosku powinny być bardziej wyszczególnione i wyodrębnione z tekstu ciągłego, na przykład w postaci punktów, co pozwoliłoby na polepszenie aspektów wizualnych prezentowanego projektu. Oczywiście prezentacja wniosku w obecnej formie jest właściwa, zwracam jedynie uwagę w jaki sposób można by dokonać poprawek.

W uzasadnieniu poniesionych kosztów nie ma informacji na temat kosztu zakupu myszy. Jeśli wnioskodawcy pozyskają zwierzęta w inny sposób, powinno zostać to napisane we wniosku.

Nie zostało wyjaśnione, dlaczego badania będą prowadzone wyłącznie na samcach, ponieważ mogą istnieć różnice między płciami w kontekście zgłębianego tematu ■

Magdalena Żywicka:

Temat, podjęty w powyższym projekcie, jest jednocześnie niezwykle ciekawy, jak i ważny. Wykazuje on bezdyskusyjną wartościowość pod względem rozwoju nauki. Prace nad ludzkim mikrobiomem oraz jego interakcjami z gospodarzem są aktualnie szeroko podejmowanym tematem, który stanowi ważne uzupełnienie kwestii badanych przez lata aspektów genetycznych oraz epigenetycznych. Ponieważ wpływ mikrobiomu człowieka na jego fizjologię oraz behavior jest dziedziną wiedzy, która zaczęła być zgłębianą stosunkowo niedawno, wszelkie dane na ten temat, jakie mogą przynieść nowe badania są niezwykle ważne. Oczywisty jest informacyjny charakter opisanego projektu, oznaczający iż prezentuje on badania podstawowe. Bardzo drobne poprawki językowe mogłyby jednak uwypuklić naukowy charakter wniosku. Sugerowane jest zmienienie zdań w pierwszej osobie liczby mnogiej na stronę bierną. Tak drobny zabieg podkreśliłby profesjonalizm zespołu w formułowaniu zarówno projektów badawczych, jak i publikacji naukowych.

Podział streszczenia na trzy bloki jest właściwym wyborem, ułatwiającym czytelnikowi syntetyczne zapoznanie się z prezentowaną tematyką oraz planowanymi badaniami. Rozbudowanie tej części jest proporcjonalne do objętości pozostałych elementów wniosku. Pochwalić należy klarowne uzasadnienie nowatorskości pomysłu oraz jego znaczenia dla społeczeństwa. Jednocześnie warto zauważyć, iż podjęta tematyka jest na tyle interesująca, iż ma potencjał, by trafić nawet do szerszego grona odbiorców tekstów popularnonaukowych.

W opisie celu projektu niezwykle wartościowe jest zarysowanie luki w aktualnym stanie wiedzy na temat interakcji pomiędzy mikrobiomem, a gospodarzem. Stanowi to podwaliny do uzasadnienia wartości wniosku. Głównym minusem tej części projektu jest fakt braku wyraźnego podkreślenia celu badań. Został on umieszczony na samym końcu tego rozdziału, co wydaje się rozsądnym wyborem, jednak wymagającym

wyróżnienia problemu badawczego i/lub hipotezy. Graficzne podkreślenie, na przykład w postaci wypunktowania, pomogłoby czytelnikowi w szybkiej identyfikacji podstawowego celu badania. Potrzebne jest także jasne rozróżnienie hipotez, gdzie jedna jest rozwinięciem drugiej. Hipotezy na temat konfliktu zapotrzebowania na określone składniki w obrębie holobiomu oraz tego, że to właśnie mikrobiom będzie stroną dominującą względem wpływu na preferencje pokarmowe, wymagają wyraźnego rozdzielenia. Druga z nich nie jest nawet określona mianem hipotezy. Wspomniana zostaje także kwestia wpływu deprivacji pokarmowej na preferencje względem pożywienia. Sposób zapisu wskazuje, iż przewidywaniem zespołu badawczego jest, że to właśnie mikrobiom, nie zaś deprivacja, jest czynnikiem kluczowym w wyborze pokarmu przez myszy. Z kolei w części na temat planu badań istnienie wpływu deprivacji, opisane jest jako jedna z dwóch hipotez. Wskazane jest jasne sformułowanie wszystkich hipotez i umieszczenie ich właśnie w rozdziale na temat celu badawczego. Zmiana formy zapisu tych przewidywań badawczych umożliwiłaby odbiorcy szybką orientację w kluczowych założeniach projektu.

Część poświęconą znaczeniu projektu warto rozszerzyć o spostrzeżenia, które wnioskodawcy zasygnalizowali w streszczeniu. Są one tam wypunktowane w sposób bardzo celny. Rozwinięcie ich i uwzględnienie w tym rozdziale byłoby jeszcze bardziej przekonujące.

W planie projektu brakuje uwzględnienia czasowego rozkładu planowanych badań. Wskazane byłoby także umieszczenie informacji na temat tego w jakiej formie (w jakich i ilu czasopismach oraz konferencjach?) zaprezentowane zostaną uzyskane wyniki. Sugerowane jest także zarysowanie przykładowych periodyków, w których mogłyby zostać opublikowane rezultaty opisanego projektu.

Opis metodyki i materiałów badawczych jest przedstawiony w sposób niezwykle klarowny i przystępny. Jednocześnie jest on na tyle szczegółowy, iż czytelnik może bardzo dokładnie zapoznać się z przebiegiem planowanych procedur. Jedynym ulepszeniem formy prezentacji metodyki mogłaby być infografika. Charakter eksperymentów badawczych bardzo łatwo i przejrzysto można przedstawić w formie wizualnej. Dodanie takiego ulepszenia byłoby ogromną pomocą dla odbiorcy, który miałby możliwość orientacji w planach badawczych w bardzo krótkim czasie i uzupełnienia swoich wątpliwości o przedstawiony opis.

Wskazane jest uzasadnienie z jakiego powodu do obu eksperymentów wybrane zostaną wyłącznie samce myszy. Może to prokurować wątpliwości względem tego, iż grupa ta może nie być reprezentatywna, ponieważ na preferencje pokarmowe wpływ wywierają mogą także inne czynniki warunkowane płciowo, jak na przykład poziom hormonów. Uzasadnienie doboru wyłącznie samców wydaje się konieczne.

Projekt został skonstruowany oraz rozpisany na bardzo wysokim poziomie. Braki, które można wykazać, mają marginalny charakter i nie mogą wpłynąć na to, iż powyższy wniosek ocenić należy jako bardzo dobry ■

FINALNA WERSJA PROJEKTU ■

MICROBIOME AS A DRIVING FACTOR OF FEEDING PREFERENCES

AUTHORS:

Krzysztof Miler, Hanna Tutaj, Katarzyna Woch

PROJECT SUMMARY:

1. Research project objectives / research hypothesis ■

Members of the microbiota (bacterial community inhabiting host organism) require different

nutrients to function properly. One can hypothesize that because of their specific food preferences, conflict over resource acquisition may arise within the host system. In that case microbes would be under selective pressure to change host dietary preference to promote own fitness at the expense of host interests. There is some evidence which indicates a connection between food preferences and the composition of microbiota, e.g. humans with identical diet differing only in chocolate consumption were shown to differ slightly in microbial metabolites which supposedly feedback on their chocolate preference. More studies of the co-evolution of the microbiota with their hosts are urgently needed, especially in context of microbiota-host conflict.

The main objective of this project is to answer the question: can the microbiome alter host feeding behavior to benefit the microbes at the expense of host? We want to achieve this goal by investigating particular microbiota enterotype influence on feeding preferences of mice, *Mus musculus*. We hypothesize that microbiome alters host feeding behavior and thus predict that hosts should prefer different types of food depending on their enterotype. Experiment investigating effect of microbiota community on feeding preferences will be complemented by another, examining feeding preferences after elimination of microbial factor. Under such conditions we predict that no feeding preferences should occur. We designed this second in a way allowing to simultaneously test whether differing nutritional status affects feeding preferences. This will give us more complete picture of the issue.

2. Research project methodology ■

We will conduct two experiments which will allow us to answer our research question. We will use germ-free mice as our model organism. In the first study we will obtain four groups (25 individuals in each) which will vary in presence of different gut microbial communities (none, *Bacteroides*, *Prevotella* or *Bacteroides* and *Prevotella*). In order to see whether microbiome can manipulate host feeding preferences we will expose mice from each group to different food types (which will differ in terms of protein, fat and carbohydrate proportion) and gather data about their preferences. In the second experiment we will also obtain four groups of mice (25 individuals in each), which will be treated with diet differing in protein, fat and carbohydrate proportion. Then their food preferences will be tested in the same manner as in the first experiment. In both experiments, mice will be kept in sterilized conditions to avoid contamination from any source other than experimental manipulation. Feces will be daily analyzed for each mice in each experiment to confirm that their microbial status is accurate.

3. Expected impact of the research project on the development of science, civilization and society ■

Learning about the importance of microbiome and its possible impact on feeding behavior will allow us to fill a gap in knowledge. Ability of gut microbial community to affect dietary patterns might later on increase susceptibility to diseases connected to pathology of eating. Hence, our results can potentially contribute to our knowledge about mechanisms of eating disorders, which pose a serious social problem. Project effects include original research publication in general, high impact factor journal, and results presentation during international conferences. Furthermore, we plan to publish our conclusions in popular journals.

SHORT RESEARCH DESCRIPTION:

1. Project goal ■

Every organism is immersed in its environment and acts as environment for other organisms. Consider an example of microbes residing inside their hosts. These microbes interact with their environment and have profound effects on their hosts (Hooper et al. 2002). Inhabited organisms function in their own environment on which they impose various effects, but they also feedback on microbes residing within them (Ezenwa et al. 2012). This interaction is extensively studied from the perspective of how hosts are affected since it became apparent that the so-called microbiome (microbe diversity inside hosts) has impact on host health (for a recent review see Sánchez et al. 2017). Our knowledge about microbiome significance has raised dramatically in recent decade, especially in the context of human medicine (Thaiss et al. 2016). However, what is lacking is testing this type of relationship from evolutionarily-informed approach (Dittmer et al. 2016).

One of the most basic questions that come to mind when thinking about the so-called holobiome (host together with its microbiome) is what kind of interaction is it? In other terms, what are costs and benefits of this type of interaction for both hosts and microbiome? The answer is, of course, extremely complex, as these relationships span from mutualisms to parasitisms depending on context and species involved (Ezenwa et al. 2012). Cases on the extremes of mutualism-parasitism continuum are most interesting and potentially insightful because effects of host-microbiome interrelation are then most pronounced. For example, fruit flies were shown to be manipulated by their own microbiota into mating with individuals with similar microbiota, thus acting in interests of their microbiome to isolate own population (Sharon et al. 2010). Here, we are interested in the parasitic end of this continuum too, and further, on the perspective of host behavior being tightly linked to the presence of microbiome and its characteristics. It can be hypothesized that in conditions of co-evolution between parties involved in the holobiome, host behavior becomes inextricably linked to the fitness interests of its microbiome (Norris et al. 2013). This is evident when considering e.g. the role of microbiome for physiological, behavioral and evolutionary processes in various insects (extensively studied group in this context), where some of the most spectacular examples of host manipulation by microbiome can be found (Lewis and Lize 2015). Here, we hypothesize that fitness interests of the microbiome may not align with host fitness interests, thus creating conflict in which microbiome may evolve adaptations to force hosts to behave in a certain way, serving their interests in terms of substrate delivery (through host feeding preferences). To test this hypothesis, we want to perform an experiment using a mice model (*Mus musculus*) in which we want to manipulate host microbiome composition and investigate between-group differences in consumption of different types of food. We expect that food preferences should become apparent in case of groups with certain microbiota, which show interests that are known to not align with their host interests. If our prediction will be confirmed, then we will show evidence of host behavioral manipulation by microbiome. Further, we want to perform another, similar experiment, in which we will explore whether mice lacking microbiome show no feeding preferences. Due to the fact that this experiment may be designed simultaneously to test possible role of nutrient deprivation as a driving force of feeding preferences, we will also use it to explore the role of different prolonged diet on food choice (Alcock et al. 2014). This will enable us to interpret our results in broader ecological context.

2. Project significance ■

Selection pressures among participants of the holobiome go both ways when co-evolution between involved parties occurs (Norris et al. 2013; Dittmer et al. 2016). Based on various interdependent features of hosts and their microbiome, adaptations and counteradaptations can be presumed to form. Indeed, it is now acknowledged that microbiome characteristics correlate with various traits of their hosts, especially in context of health and disease (Thaiss et al. 2016). However, our gap in knowledge in terms of this issue is vast (Ezenwa et al. 2016). When this project will be completed, this will be novel and important study on the issue, performed from the perspective of conflicting microbiome and host interests. Our overreaching goal is to determine the importance of microbiome for food preferences on an example of mice (*Mus musculus*), which is a model organism. Thus, our results will not only give us answers to important questions regarding nutritional decisions but also broaden our understanding of model species used in research. Furthermore, ability of microbial community to affect dietary patterns might later on increase susceptibility to diseases connected to pathology of eating in microbiome host. We expect our results to be of broad interest and thus well publishable.

3. Research plan ■

Ethics Committee opinion will be obtained before project starting in order to follow all institutional and national guidelines for the care and use of laboratory animals in force in Poland, the country in which research will be conducted. After obtaining all permits, we will proceed to the first experiment testing whether microbiota may affect food preferences of mice. Then, we will proceed to the second experiment testing whether mice lacking microbiota show no feeding preferences and whether dietary status may affect their food preferences. Both these experiments are high-risk, but we feel confident that our research plan will allow us to smoothly perform them and obtain results. We account for some losses of our experimental animals by planning to obtain a slight surplus of them.

In the first experiment, germ-free mice which lack intestinal microbiota will be obtained and kept in laboratory sterile conditions to acclimatize. Then their microbiota will be manipulated to create four different groups of mice: (1) germ-free with control null enterotype showing no preferences in diet, (2) *Bacteroides* enterotype representing microbiota with preference for high fat and high protein diet, (3) *Prevotella* enterotype as microbiota with preference for high carbohydrate diet, and (4) *Bacteroides* and *Prevotella* enterotype imitating preference for all types of previously mentioned nutritional substances. Relationship between each enterotype and possible food preferences are supported by the literature (Wu et al. 2011). The fitness interest among different microbiome composing species do not have to be unified because different types of microbes compete over available nutrients and habitats. The more diverse the microbiota, the less pressure should be put on a host, as more resources will be used on intra-microbiomic competition. Less diverse populations consisting of species with large population sizes and more resources available should have more power to manipulate host behavior, e.g. through more easily established quorum (Dethlefsen et al. 2007; Lozupone et al. 2012; Rutherford and Bassler 2012). After establishing the four groups, a cafeteria experiment will be conducted with mice choosing protein, fat, or carbohydrate food. Based on the amount of consumed food of each type in each group, food preferences can be specified and then compared between enterotypes. This comparison should determine whether microbiome manipulates its host to choose food that microbiome prefers.

The second experiment will allow us to determine whether mice without microbiota show no food preferences at all, as we predict. Since there are some premises that nutrient deprivation may result in altered food preferences (Gough 2010), we designed this experiment to also test effect of nutritional status of the host on its feeding preferences. In this experiment, after acclimatization, we will expose mice belonging to four groups to single type of diet lacking sufficient intake of a particular nutrient: (1) low-carbohydrates, (2) low-protein, (3) low-fat, or (4) standard, fully nutritional food, in order to differently change the nutritional status of the animals belonging to different groups. After a weeklong treatment period a cafeteria experiment will be performed as in the first part of the project. Based on the amount of consumed food of each type in each group, food preferences can be specified and then compared between groups differing in nutritional status. This comparison should determine whether host chooses food based on its own motivational state stemming from nutritional status.

Experiments will be conducted in Ośrodek Medycyny Eksperymentalnej i Innowacyjnej in Kraków (OMEII) as this institution has all the required equipment and conditions to conduct this research. Genetic analyses will be conducted in Uniwersytet Jagielloński in Kraków where researchers are stationed and all the required equipment and conditions are available. We plan to begin this project in Jan 2018 and expect that it will take until Dec 2018 to obtain all necessary equipment and conduct both planned experiments along with full data gathering. Remaining time (Jan-Dec 2019) will be devoted to data analysis and interpretation, followed by manuscripts preparation, conference attendance, and project promotion.

We acknowledge that conducting research on germ-free mice can be viewed as ecologically incorrect, but we want to note that this project is only a first inquiry into the presented issues, and furthermore, germ-free animals are often used to address questions related to microbiota (Al-Asmakh and Zadjali 2015).

4. Methodology ■

In the first experiment, we will use 100 germ-free six-week-old mice from Charles River colonies (ANAXEM, France) with 1:1 sex ratio. After transportation to the laboratory animals will be kept separately in small germ-free isolators (Igenia, France) with ad libitum autoclaved deionized water and irradiated normalized diet (Research Diet Inc., USA) delivered on three dishes placed on a tray rotating automatically by 90° every hour. Animals will be left for a week to allow acclimatization to these laboratory conditions. Water and food will be switched for fresh ones each day. Lack of bacterial communities in mice will be confirmed with daily feces analysis (described below). After acclimatization, animals will be divided into four groups and the experiment will begin (50 males and 50 females of obtained group of mice will be randomly divided). Groups will be treated differently in terms of their acquired microbiota. First group, control, will receive pure autoclaved saline into their water supply. Other three groups will receive pure autoclaved saline cocktails

with bacterial strains into their water supply in order to establish groups differing in enterotypes (microbiome presence). Cocktails will contain *Bacteroides*, *Prevotella* or *Bacteroides* and *Prevotella* strains for second, third and fourth group. This will result in obtaining four groups with different enterotypes: first with null enterotype, second with *Bacteroides* enterotype, third with *Prevotella* enterotype, and fourth with mixed enterotype. Cocktails will be prepared with standard method: cultures of *Bacteroides* and *Prevotella* will be brought (ATCC, USA) and transported to the laboratory where they will be grown anaerobically (37°C, 5% CO₂) in MRS broth (Sigma-Aldrich, USA) prior to the experiment; prepared pellets will be harvested and diluted with pure autoclaved saline (Sigma-Aldrich, USA) to desired dose of 1 * 10²⁰ CFU (in case of fourth group, proportion of *Bacteroides*:*Prevotella* strains will be 1:1, 1 * 10¹⁰ CFU each). The 1 * 10¹⁰ CFU dose should be effective for colonization. Water supply for each group will be switched for fresh one on each day for two weeks during which saline alone or saline cocktails will be administered. This time should be effective for enterotype establishing. During this time feces will be collected each day for analysis confirming enterotypes (described below). Afterwards, a cafeteria experiment will be conducted. During the experiment, ad libitum autoclaved deionized water supply will be provided for each group, which will receive different types of food they will be allowed to choose from (Research Diet Inc., USA). Food will be irradiated and delivered ad libitum on a tripartite tray rotating automatically by 90° every hour, with three dishes containing food, as before. In terms of protein:fat:carbohydrates proportion, first dish will be characterized by 0:0:1 ratio, second dish with 0:1:0 ratio and third dish with 1:0:0 ratio. Food amount of each type will be fixed and we will measure its mass after a day to determine how much was consumed and thus what the food preference is.

Daily feces analysis for sterility confirmation and enterotype establishing confirmation will be done in order to exclude individuals which became contaminated and which failed to establish desired enterotype. Feces samples will be frozen at -80°C each day immediately after collection. After the end of the cafeteria experiment microbiome DNA from each sample will be extracted using FastDNA™ 50 mL SPIN Kit for Soil (MP Biomedicals, USA). Microbial community profiles confirming enterotypes will be obtained by sequencing of 16S ribosomal DNA (rDNA). Library will be prepared with Nextera XT v2 Index Kit (Illumina Inc., USA). Sequencing will be performed on the Illumina MiSeq platform (MiSeq Reagent Kit v.2, 500 cycles) according to the manufacturer's specifications generating paired-end reads of 300 bases length in each direction. Data analysis and interpretation will be performed using 16S Metagenomics workflow (Miseq Reporter software, Illumina Inc.).

Second experiment will be conducted on another 100 germ-free mice of the same origin and in the same age, with 1:1 sex ratio. In the laboratory, animals will be kept in the same manner as in the first experiment for a weeklong acclimatization. Then, mice will be randomly divided into four groups and then each group will receive different diet resulting in different nutritional status. First (control) group will be fed with food containing 1:1:1 proportion of protein:fat:carbohydrates, second will be treated with low-carbohydrate, third with low-protein and fourth with low-fat diet (Research Diet Inc., USA). Delivered food will be irradiated whereas water will be autoclaved and deionized; both available ad libitum. Animals will be left for a week to stabilize nutrient deprivation (Duca et al. 2012). Water and food will be replaced each day. Afterwards, a cafeteria experiment will be conducted as in the first experiment. Same type of data will be gathered.

Data will be gathered as mass of each food source chosen by mice in each group (dependent variable). It will be analyzed using one-way ANOVA with microbiota and nutritional deprivation as fixed factors (in the first and the second experiment, respectively). We do not include sex as a factor because we have no predictions about sex differences and we expect both sexes to show the same effects. Experimental protocol for this project is based on methods previously used on mice studied in the context of their microbiota (Duca et al. 2012; Zavisic et al. 2012; Jeong et al. 2017; Pazzini et al. 2017).

5. Literature ■

Alcock, Maley and Aktipis 2014 *Is eating behavior manipulated by the gastrointestinal microbiota? Evolutionary pressures and potential mechanisms.* BioEssays 36, 940-949.

Al-Asmakh and Zadjali 2015 *Use of germ-free animal models in microbiota-related research.* J Microbiol

Biotechnol 25, 1583-1588.

Dethlefsen, McFall-Ngai and Relman 2007 *An ecological and evolutionary perspective on human-microbe mutualism and disease.* Nature 449, 811-818.

Dittmer, van Opstal, Shropshire, Bordenstein, Hurst and Brucker 2016 *Disentangling a holobiont – recent advances and perspectives in Nasonia wasps.* Front Micro 7, 1478.

Duca, Swartz, Sakar and Covasa 2012 *Increased oral detection, but decreased intestinal signaling for fats in mice lacking gut microbiota.* PLoS ONE 7, e39748.

Ezenwa, Gerardo, Inouye, Medina and Xavier 2012 *Animal behavior and the microbiome.* Science 338, 198-199.

Ezenwa, Archie, Craft, Hawley, Martin, Moore and White 2016 *Host behaviour-parasite feedback: an essential link between animal behaviour and disease ecology.* Proc R Soc B 283, 20153078.

Gough 2010 *Even flies have cravings.* Sci Sign 3, ec178.

Hooper, Midtvedt and Gordon 2002 *How host-microbial interactions shape the nutrient environment of the mammalian intestine.* Annu Rev Nutr 22, 283-307.

Jeong, Kim, Kang, Kim, Song, Kim and Seo 2017 *Modulation of gut microbiota and increase in fecal water content in mice induced by administration of Lactobacillus kefirifaciens DN1.* Food Funct 8, 680.

Lewis and Lize 2015 *Insect behaviour and the microbiome.* Curr Opin Ins Sci 9, 86-90.

Lozupone, Stombaugh, Gordon, Jansson and Knight 2012 *Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota.* Nature 289, 220-230.

Norris, Molina and Gewirtz 2013 *Bacteria control host appetites.* J Bact 195, 411-416.

Pazzini, Pereira, Aparecida de Silva, Montalvany-Antonucci, Macari, Marques and de Paiva 2017 *Probiotic consumption decreases the number of osteoclasts during orthodontic movement in mice.* Arch Oral Biol 79, 30-34.

Rutherford and Bassler 2012 *Bacterial quorum sensing: its role in virulence and possibilities for its control.* Cold Spring Harb Med 2, a012427.

Sánchez, Delgado, Blanco-Míguez, Lourenço, Gueimonde and Margolles 2017 *Probiotics, gut microbiota, and their influence on host health and disease.* Mol Nutr Food Res 61, 1600240.

Sharon, Segal, Ringo, Hefetz, Zilber-Rosenberg and Rosenberg 2010 *Commensal bacteria play a role in mating preference of Drosophila melanogaster.* PNAS 107, 20051-20056.

Thaiss, Zmora, Levy and Elinav 2016 *The microbiome and innate immunity.* Nature 535, 65-74.

Wu, Chen, Hoffmann, Bittinger, Chen, Keilbaugh, Bawtra, Knights, Walters, Knight, Sinha, Gilroy, Gupta, Baldassano, Nessel, Li, Bushman and Lewis 2011 *Gut microbial enterotypes.* Science 334, 105-108.

Zavistic, Petricevic, Radulovic, Begovic, Golic, Tipisirovic and Strahinic 2012 *Probiotic features of two oral Lactobacillus isolates.* Brazil J Microbiol 43, 418-428.

Project budget ■

Item	Funds for each budget year (PLN)		
	2018	2019	Total
• Direct costs	351000	94000	445000
• salaries and benefits	56000	54000	110000
• equipment	15000	0	15000
• other direct costs	280000	40000	320000
• Indirect costs	67200	18800	86000
• Total costs	418200	112800	531000

Justification of costs ■

Direct costs

7. salaries and benefits (110000 PLN in total): 108000 PLN per year for three researchers to finish the proposed project (1500 PLN per month per researcher), 2000 PLN for an engineer to design and prepare the electronic tray for cafeteria parts of the project (compatible with equipment for sterile maintenance of mice in OMEII);

8. equipment (15000 PLN in total): laptop with software for each researcher, for data analysis and manuscript writing (5000 PLN per laptop per researcher);
9. other direct costs (320000 PLN in total): 100000 PLN for analysis of sterility confirmation and enterotype establishing confirmation (reagents and kits), 100000 PLN for germ-free mice purchase and sterile transport, 20000 PLN for bacteria-related costs (buffers, dishes, bacterial cultures), 10000 PLN for externally obtained specialized food supply, 50000 PLN for cooperation costs with OMEII (renting of sterile room and isolators with HEPA filters), 20000 PLN for open access publication and linguistic correction of manuscript, 20000 PLN for conference attendance for three researchers.





CIEMNE PODNIEBIENIE U SZCZENIĄT I DOROSŁYCH OSOBNIKÓW DUŻYCH RAS PSÓW DOMOWYCH (*CANIS FAMILIARIS L.*) JAKO WSKAŹNIK WYSOKIEGO POZIOMU AGRESYWNOŚCI I INTELIGENCJI – PRAWDA, CZY MIT?

PIERWOTNA WERSJA PROJEKTU ■

CIEMNE PODNIEBIENIE U SZCZENIĄT *CANIS FAMILIARIS L.* WSKAŹNIKIEM AGRESYWNOŚCI I INTELIGENCJI DUŻYCH RAS PSÓW U DOROSŁYCH OSOBNIKÓW – PRAWDA, CZY MIT

AUTORZY:

Anna Gądek, Agnieszka Janas, Paulina Wietrzyk

STRESZCZENIE PROJEKTU:

Miłośnicy psów wciąż opierają się na niezweryfikowanych metodą naukową informacjach związanych z zachowaniami czworonogów. Najlepszym przykładem jest porzekadło dotyczące związku ciemnej pigmentacji podniebienia psa i jego agresywnego zachowania.

W prezentowanych badaniach, na przykładzie trzech ras psów: labrador retriever, owczarek niemiecki, amerykański pit bull terier, sprawdzone zostanie czy czarne podniebienie psa ma związek z wyższym poziomem agresji. Zweryfikowana zostanie także zależność wyższego poziomu agresji z wyższą inteligencją z uwzględnieniem inteligencji emocjonalnej psa. Badania te pozwolą również na sprawdzenie dotychczasowych informacji dotyczących poziomu agresji u poszczególnych ras.

Badania prowadzone będą w trzech etapach: (1) badanie korelacji koloru podniebienia z wysokim poziomem agresji; (2) badanie korelacji agresji z inteligencją z uwzględnieniem inteligencji emocjonalnej; (3) badanie korelacji dotyczącej zmiany poziomu agresji psa wraz z wiekiem.

Uzyskane wyniki przyczynią się do zwiększenia stanu wiedzy dotyczącej poziomów agresji, inteligencji oraz inteligencji emocjonalnej u poszczególnych psów w aspekcie hodowli, kupna lub adopcji psa.

SKRÓCONY OPIS PROJEKTU:

1. Cel naukowy projektu ■

Głównym celem naukowym projektu jest znalezienie odpowiedzi na pytanie czy ciemne podniebienie u szczeniąt *Canis familiaris L.* jest wskaźnikiem późniejszej agresywności oraz inteligencji u dorosłych osobników psów dużych ras.

Projekt ten umożliwi weryfikację hipotez zakładających:

- (a) związek czarnego podniebienia u psów z wysokim poziomem agresji;
- (b) związek agresji z inteligencją;
- (c) niewykazywanie agresywnych zachowań wobec właściciela przez psy o wyższym poziomie inteligencji emocjonalnej;
- (d) zmianę poziomu agresji wraz z wiekiem.

Oczekiwany rezultatem jest określenie poziomu agresji, inteligencji i inteligencji emocjonalnej u poszczególnych psów oraz weryfikacja dotychczasowych poziomów agresji u badanych ras (labrador retriever, owczarek niemiecki, amerykański pitbull terier).

2. Znaczenie projektu ■

Od wieków tytułem najlepszego przyjaciela człowieka odznaczany był pies. W świetle tego relacja pies-człowiek może być postrzegana jako rodzaj symbiozy (Rindos i in. 1980). Szczególnie istotna wydaje się być konwergencja zachowań społecznych obserwowanych u psów wobec ludzi w powiązaniu z ludzkimi zachowaniami społecznymi. Nie tak dawno zwrócono uwagę na znacznie bardziej efektywne odczytywanie ludzkich zachowań przez psy niż u blisko spokrewnionych z człowiekiem ssaków naczelnych (Hare i Tomasello 2005). Tłumaczy to także powszechne wykorzystywanie psów w służbie człowiekowi oraz dużą popularność czworonogów jako domowych pupili. Pod tym względem szczególnie pożądanymi cechami psiej osobowości jest towarzyskość i figlarność (Svartberga and Forkmanb 2002). Pomimo faktu, że w każdym zakątku Ziemi gdzie obecny jest człowiek, towarzyszy mu pies, z perspektywy badawczej nie cieszy się on dużą popularnością (Hare i Tomasello 2005). Co gorsza, miłośnicy psów wciąż opierają się na niezwyfikowanych metodą naukową informacjach związanych z zachowaniami czworonogów. Najlepszym przykładem jest porzekadło dotyczące związku ciemnej pigmentacji podniebienia psa i jego agresywnego zachowania. Agresja jest nieodzownym elementem psiego zachowania, jednakże u niektórych osobników jej poziom może być na tyle wysoki, że nie będzie on akceptowalny przez człowieka.

Typ i poziom agresji psiego temperamentu warunkowane mogą być wieloma czynnikami środowiskowymi, jak również genetycznymi (Netto i Plana 1997). Ostatni czynnik jest szczególnie istotny w świetle zaproponowanego tematu badań, którego wynik potwierdzający wskazywałby na fenotypowy przejaw genotypu warunkującego agresywne zachowanie. Prowadzone dotychczas badania dotyczące pigmentacji wewnątrz jamy ustnej psów (m.in. warg, języka) były najczęściej związane ze zmianami patologicznymi, charakterystycznymi dla chorób nowotworowych czworonogów (Dummet i in. 1964). Fizjologiczne podłoże pigmentacji nabłonka u psów ma związek z depozycją w komórkach barwnika – melaniny (Dummet i Barens 1978). Informacji na temat powiązania produkcji pigmentów ze szlakami metabolicznymi na chwilę obecną dostarczają jedynie badania prowadzone na hodowli lisów, mające na celu odpowiedni dobór krzyżowanych osobników z intencją otrzymania potomstwa o jak najbardziej łagodnym usposobieniu (Goldman 2010). W badaniu tym odnotowano zmiany dotyczące ubarwienia skóry w zależności od poziomu hormonu adrenaliny. Wyniki te wskazują na modyfikującą rolę adrenaliny na biochemiczny szlak melaniny, która wpływa na pigmentację skóry (Goldman 2010). Jednakże badania prowadzone przez Conroy i Beamer (1970) wskazują na odmienne szlaki depozycji melaniny w skórze i w jamie ustnej. Zagadnienie to wydaje się szczególnie istotne w odniesieniu do osobników reprezentujących rasy o skrajnie odmiennym temperamencie.

Efektom niniejszych badań będzie rzetelna informacja dla hodowców oraz osób zainteresowanych kupnem lub adopcją psa o predyspozycjach czworonoga do przejawiania łagodnego lub agresywnego usposobienia. Porównanie osobników reprezentujących rasy różniące się temperamentem posłuży do weryfikacji dotychczas postulowanego poziomu agresji u badanych ras.

3. Koncepcja i plan badań ■

Podstawowa koncepcja: Projekt zakłada badania nad poziomem agresji u psa, który często bezpodstawnie wiązany jest z czarnym kolorem psiego podniebienia. Ponadto istnieją badania korelujące poziom agresji z poziomem psiej inteligencji. Prezentowany projekt ma na celu nie tylko sprawdzenie zasadności stwierdzenia dotyczącego korelacji barwy podniebienia z agresją, ale także zweryfikowanie słuszności hipotezy zakładającej, że pomimo wysokiego poziomu agresji psy o wyższym poziomie inteligencji emocjonalnej nie będą atakowały właściciela.

Problem do rozwiązania: szczegółowe zbadanie poziomu agresji u psa, poziomu jego inteligencji oraz inteligencji emocjonalnej z uwzględnieniem zmian zachodzących u psa określonej rasy wraz z wiekiem.

Zarys planu projektu

Projekt będzie realizowany w trzech etapach. W każdym z etapów dane zbierane będą w obrębie trzech ras psów (80 osobników reprezentujących daną rasę):

I. Badanie korelacji koloru podniebienia z wysokim poziomem agresji

a. Zbiór danych – przebadanych zostanie 120 osobników dorosłych z podziałem na trzy rasy oraz dwie kategorie barwy podniebienia: jasna; ciemna.

- Pozyskanie danych od właściciela z użyciem formularzy w pięciostopniowej skali Godmann'a.
- Pozyskanie danych przy pomocy dwóch testów o różnym stopniu stymulacji określających poziom agresji w pięciostopniowej skali Godmann'a, przeprowadzanych w warunkach kontrolowanych.

b. Analiza statystyczna – korelacja koloru podniebienia z danymi pozyskanymi od właścicieli oraz uzyskanymi poprzez testy z uwzględnieniem rasy psa.

II. Badanie korelacji agresji z inteligencją z uwzględnieniem inteligencji emocjonalnej

a. Zbiór danych – przebadanych zostanie 120 osobników dorosłych z podziałem na trzy rasy.

- Pozyskanie danych przy pomocy testu na inteligencję oraz testu na inteligencję emocjonalną.

b. Analiza statystyczna – korelacja danych pozyskanych poprzez testy z danymi dotyczącymi poziomu agresji u psa z uwzględnieniem rasy.

III. Badanie korelacji dotyczącej zmiany poziomu agresji psa wraz z wiekiem

a. Zbiór danych – przebadanych zostanie 120 osobników młodych z podziałem na trzy rasy w dwóch seriach badań: w wieku dwóch miesięcy i po czterech miesiącach od wykonania pierwszych testów.

- Pozyskanie danych przy pomocy dwóch testów o różnym stopniu stymulacji określających poziom agresji w pięciostopniowej skali Godmann'a, przeprowadzanych w warunkach kontrolowanych.

b. Analiza statystyczna – korelacja poziomów agresji uzyskanych z testów wraz z różnym wiekiem z uwzględnieniem rasy psa.

Ocena ryzyka: brak ryzyka związanego z terminową realizacją wszystkich zadań badawczych projektu.

4. Metodyka badań ■

Dobór psów – ze względu na trudność rozróżnienia zachowań agresywnych pomiędzy osobnikami psów, w badaniu bierzemy pod uwagę zachowania wobec człowieka. Badane będą psy dorosłe oraz szczenięta wychowywane przez prywatnych właścicieli. Właściciel może posiadać tylko jednego psa (psy nie uczą się zachowań od siebie nawzajem) nieprowadzonego przez wykwalifikowanych treserów. Badane będą trzy rasy psów dobierane wg klas agresji wg Polsky (1984):

3. labrador retriever – rasa nieagresywna;
4. owczarek niemiecki – rasa pośrednia;
5. amerykański pit bull terier – rasa agresywna.

Każdy z badanych psów musi posiadać rodowód potwierdzony certyfikatem. Łącznie przebadanych zostanie 80 osobników jednej rasy z uwzględnieniem koloru podniebienia (jasne/ciemne) oraz kategorii wiekowej:

- psy dorosłe dwudziestomiesięczne – 40 osobników;
- szczeniaki dwumiesięczne – 40 osobników.

Miejsce badań i elementy bezpieczeństwa – testy wykonywane będą w pomieszczeniu zamkniętym co lepiej pozwoli kontrolować warunki i sytuację, w której pies będzie stymulowany (Netto & Plana 1997). Właściciel psa będzie zobligowany do przyniesienia ulubionej karmy dla psa oraz psiego legowiska lub koca, które będzie ustawione w jednym z kątów pomieszczenia doświadczalnego, co przyczyni się do zapewnienia poczucia bezpieczeństwa, miejsca odpoczynku, a także wystąpienia zjawiska obrony terytorialnej. Każdy pies przed wykonaniem testów będzie spędzał ze swoim właścicielem w pomieszczeniu badawczym ok. 30 minut w celu aklimatyzacji. W przypadku problemu z aklimatyzacją badanie zostanie przerwane. Z uwagi na bezpieczeństwo w czasie wykonywania testów pies zostanie zapięty na długiej smyczy, niekrępującej jego ruchów. Osoba testująca otrzyma wskazówki jak blisko może podejść względem stymulowanego psa w

zależności od testu. Zachowanie psa będzie obserwowane oraz nagrywane.

Dane pochodzące od właściciela – zebranie informacji dotyczących psa na podstawie opinii właściciela w oparciu o formularz z pytaniami:

I. Czy uważa Pan/Pani, że pies jest: (a) łagodny; (b) agresywny.

II. Czy w przeciągu ostatniego miesiąca pies wykazywał któreś z poniższych zachowań (wielokrotny wybór): (1) brak agresji, (2) warczenie, (3) pokazywanie zębów oraz warczenie, (4) klapanie paszczą, (5) atak z intencją ugryzienia lub ugryzienie.

III. Wiek psa.

Dane pozyskane z testów – wyniki testów notowane będą w formularzach badawczych:

a. poziom agresji u pasa (właściciel znajduje się poza strefą prowadzenia testów): ocena agresji psa określana będzie na podstawie testów behawioralnych w oparciu o 5-cio stopniową skalę Gutmann'a (DeVellis 1991): (1) brak agresji, (2) warczenie, (3) pokazywanie zębów oraz warczenie, (4) klapanie paszczą, (5) atak z intencją ugryzienia lub ugryzienie. W czasie testów odnotowany będzie najwyższy wynik osiągnięty przez psa:

2. test zachowania w obecności obcej osoby przebranej za starszą kobietę, dziwnie patrzącą, mówiącą skrzekliwym głosem, zbliżającą się do psa z laską, próbującą go pogłaskać przy pomocy rękawicy ochronnej (Winkler 1977);

3. test zachowania w obecności obcej osoby krzyczącej, klaskającej, zbliżającej się do psa i wykonującej ruchy o charakterze uderzenia i kopania w jego kierunku (brak bezpośredniego kontaktu fizycznego) (Wright 1985).

b. poziom inteligencji emocjonalnej psa (sprawdzenie agresji względem właściciela i obcej osoby; właściciel znajduje się poza strefą prowadzenia badań w przypadku testu z osobą obcą). Ocena agresji psa określana będzie na podstawie testów behawioralnych w oparciu o 5-cio stopniową skalę Gutmann'a (DeVellis 1991). W czasie testów odnotowany będzie najwyższy wynik osiągnięty przez psa:

4. test zachowania w przypadku zabieranie miski z ulubionym jedzeniem przez właściciela (Wijk and Klasen 1981);

5. test zachowania w przypadku zabieranie miski z ulubionym jedzeniem przez osobę obcą (Wijk and Klasen 1981).

c. poziom inteligencji u psa: Reakcja psa widzącego odbicie właściciela w lustrze oceniana w dwóch kategoriach: zainteresowanie odbiciem w lustrze – pies o inteligencji przeciętnej; ruch w kierunku właściciela – pies inteligentny:

10. test lustra (Howell i Bennett 2011).

Testy statystyczne – analizy statystyczne przeprowadzone zostaną przy użyciu testu U Manna-Whitneya w przypadku korelacji danych pochodzących z testów z danymi od właściciela oraz testu Kruskala-Wallis w przypadku korelacji danych uzyskanych z testów z danymi dotyczącymi rasy.

5. Literatura ■

Conroy J.D., Beamer P.D. 1970. *The Development of Cutaneous and Oral Pigmentation in Labrador Retriever Fetuses (Canis familiaris).* Journal of Investigative Dermatology 54(4): 304–315.

DeVellis, R.F., 1991. *Scale Development. Theory and Applications.* Applied Social Research Methods Series, 26, Sage Publications, Newbury Park, 121 pp.

Dummett C.O., Blackledge G.T., Bolden T.E. 1964. *Oral pigmentation in canis familiaris.* Journal of Periodontology 35(5): 416–423.

Dummet C.O., Barends G. 1978. *Animal oral pigmentation.* Journal Periodontology 49(4): 206–213.

Goldman J.G. 2010. *Man's new best friend? A forgotten Russian experiment in fox domestication.* Scientific American Blog. Dostęp on-line: 9.04.2017.

Hare B., Tomasello M. 2005. *Human-like social skills in dogs?* Trends in Cognitive Sciences 9(9): 439–444.

Howell T.J., Bennett P.C. 2011. *Can dogs (Canis familiaris) use a mirror to solve a problem?* Journal of Veterinary Behavior: Clinical Applications and Research 6(6): 306–312.

Netto W.J., Planta D.J.U. 1997. *Behavioural testing for aggression in the domestic dog.* Applied Animal Behaviour Science 52: 243–263.

Polsky R.H. 1984. *Factors influencing aggressive behaviour in dogs.* Australian Veterinary Practice 14(2): 66–69.

Rindos D., Aschmann H., Bellwood P, Ceci L., Cohen M.N., Hutchinson J., Santley R.S., Shaffer J.G., Shaw T. 1980. *Symbiosis, Instability, and the Origins and Spread of Agriculture: A New Model [and Comments and Reply]*. *Current Anthropology* 21(6): 751–772.

Svartberga K., Forkman B. 2002. *Personality traits in the domestic dog (Canis familiaris)*. *Applied Animal Behaviour Science* 79: 133–155.

Wijk J., Klasen H.J. 1981. *Hondebeten en de omstandigheden waaronder ze vobrkomen*. *Ned Tydschr Geneeskd* 125(4): 133–136.

Winkler W.G. 1977. *Human Deaths Induced by Dog Bites, United States, 1974–75*. *Public Health Report* 92(5): 425–429.

Wright J.C. 1985. *Severe attacks by dogs: characteristics of the dogs, the victims, and the attack settings*. *Public Health Report* 100(1): 55.

Kosztorys ■

Item	Funds for each budget year (zł)			
	2018	2019	2020	Total
1. Direct costs, including:	75 100 zł	91 500 zł	64 000 zł	230 600 zł
1/ Salaries and benefits	36 000 zł	36 000 zł	36 000 zł	108 000 zł
2/ Equipment	9 700 zł	0 zł	0 zł	9 700 zł
3/ Other direct costs	29 400 zł	55 500 zł	28 000 zł	112 900 zł
2. Indirect costs	13 080 zł	18 300 zł	12 800 zł	44 180 zł
Total costs (1+2)	88 180 zł	109 800 zł	76 800 zł	274 780,00 zł

Uzasadnienie kosztów ■

I ROK						
INNE KOSZTY BEZPOŚREDNIE	KOSZT EKSPERYMENTU					
		miesiąc	wiek	liczba dni eksperymentu dla 120 psów	koszt na psa	koszt
		luty	18 miesięcy	12	225,00 zł	27 500,00 zł
	2	POZYCJONOWANIE STRONY INTERNETOWEJ (z informacją o badaniach i możliwości wzięcia udziału w eksperymencie)				
		styczeń-grudzień	400,00 zł			
KOSZTY SPRZĘTU	3	KONSULTACJA BEHAVIORYSTY				
		styczeń-grudzień	1 500,00 zł			
KOSZTY SPRZĘTU	4	SPRZĘT POTRZEBNY DO EKSPERYMENTÓW				
		rodzaj	cena za sztukę	koszt		
		zabawka do testu na inteligencję emocjonalną	25	6 000,00 zł		
		miska dla psa	20,00 zł	200,00 zł		
		smycz	20,00 zł	300,00 zł		
		rękawica do testu na agresję	200,00 zł	1 000,00 zł		
		karma	50,00 zł	50,00 zł		
		kamera	1 000,00 zł	2 000,00 zł		
		lustro do testu na inteligencję	150,00 zł	150,00 zł		
	39 100,00 zł					
II ROK						
INNE KOSZTY BEZPOŚREDNIE	5 KOSZT EKSPERYMENTU					
		miesiąc	wiek	liczba dni eksperymentu dla 120 psów	koszt na psa*	kwota
		marzec	2 miesiące	12	225,00 zł	54 000,00 zł
		lipiec	2 miesiące (powtórzenie)	12		
	6	KONSULTACJA BEHAVIORYSTY				
	styczeń-grudzień	1 500,00 zł				
	55 500,00 zł					
III ROK						
INNE KOSZTY BEZPOŚREDNIE	koszt korekty językowej					3 000,00 zł
	koszty publikacji (w tym minimum jedna w renomowanym czasopiśmie np. Journal of Veterinary Behavior: Clinical Applications and Research)					10 000,00 zł
	koszt udziału w konferencjach międzynarodowych					15 000,00 zł
	28 000,00 zł					

koszt w przeliczeniu na przebadanie jednego psa zawiera koszt zryczałtowanego wynagrodzenia (dojazd właściciela z psem na miejsce badania) oraz koszt zabawki wykorzystywanej przy eksperymencie dotyczącym inteligencji emocjonalnej

RECENZJE ■

prof. dr hab. Mariusz Cichoń:

Celem projektu jest potwierdzenie, albo obalenie mitu dotyczącego zależności między ubarwieniem podniebienia i agresywnością u trzech ras psów różniących się poziomem agresji. Autorki zamierzają przeprowadzić szereg testów behawioralnych u szczeniąt i psów dorosłych należących do prywatnych właścicieli. Jeśli założymy, że projekt ten nie należy do domeny badań podstawowych to nie widzę większego problemu, ale NCN nie finansuje w bezpośredni sposób badań stosowanych, a ten projekt do takich należy, przynajmniej moim zdaniem. Projekt nie porusza żadnego naukowego pytania, które w jakikolwiek sposób zmieniałoby istniejący stan wiedzy naukowej. Wiedza uzyskana w wyniku tego projektu może być potencjalnie w zakresie zainteresowań hodowców i właścicieli psów, ale niewiele wnosi do nauki. Autorki powinny się zastanowić, czy wydanie prawie 300 tys złotych ze środków publicznych przełoży się na zyski dla społeczeństwa w szeroki kontekście nie tylko widzianym przez pryzmat grupy zainteresowanych. Nawet jeśli, to jak to społeczeństwo ma się dowiedzieć o tych doniosłych wynikach badań jeśli wykonanie tych badań wygląda, że jest celem samym w sobie. Po przeczytaniu tego projektu odnoszę wrażenie, że autorki mają potrzebę obcowania z psami i ich właścicielami, ale jakoś nie widzą potrzeby informowania społeczności naukowej o wynikach uzyskanych w proponowanym projekcie.

Projekt zasadza się moim zdaniem na dość subiektywnych przesłankach. Nie zostałem przekonany dlaczego na gruncie istniejącego stanu wiedzy należałoby się spodziewać zależności między ubarwieniem podniebienia a poziomem agresji. Najważniejszą przesłanką wydaje się mit, który ten projekt ma zamiar obalić. Nie bardzo rozumiem także co ma do rzeczy inteligencja emocjonalna, która ma być w tym projekcie także badana. Czy należy zakładać, że ubarwienie podniebienia jest także skorelowane z tą inteligencją? Pomiar planowane w tym projekcie także wydają się bardzo subiektywne. Podniebienia rozróżnia się na jasne i ciemne, ale gdzie jest granica między jasnym i ciemnym? Czy planowane rasy psów wykazują jakąkolwiek zmienność w tym ubarwieniu? Dane zbierane przy pomocy formularzy także są bardzo subiektywne. Dotyczy to także testów behawioralnych, które są bardzo podatne na efekty początkowe i subiektywność obserwatora. Do tego autorki nie informują co właściwie będzie wskaźnikiem agresywności, bo chyba jedynie operowanie takim wskaźnikiem ma jakikolwiek sens. Autorki nie przekonują dlaczego akurat wielkość próby wynosi 80 lub 120 osobników i dlaczego akurat będą rozpatrywane psy dwu- i dwudziesto-miesięczne. Kompletnie nie rozumiem co kryje się w projekcie pod nagłówkami „Analiza statystyczna” lub „testy statystyczne”. Są tu albo zbyt ogólne sformułowania, albo informacje, które wskazują, że autorki nie wiedzą w ogóle o czym piszą (vide testy U i Kruskala Wallisa do badań korelacji) ■

Ewa Bobulska:

Autorki w swoim projekcie badawczym chcą zmierzyć się z popularnym przekonaniem funkcjonującym u hodowców psów, dotyczącym związku ciemnej pigmentacji podniebienia psa i jego agresywnego zachowania. Zagadnienie to wydaje się o rzeczywiście interesujące, a skoro nie ma dotychczasowych badań nad tą zależnością, można uznać proponowany przez autorki pomysł za nowatorski. Projekt jest spójny, wszystkie etapy zostały dokładnie zaplanowane i opisane w sposób zrozumiały. Czas trwania projektu jest uzasadniony i dobrze rozplanowany. Cel projektu uważam, za jasno napisany, a poszczególne etapy eksperymentu za wyjaśnione w sposób klarowny i zadowalający.

Zastrzeżenie moje wzbudzają jedynie pewne aspekty wynikające z wykorzystania współpracy z właścicielami psów, ponieważ w tym przypadku np. trudno będzie pominąć wpływ związku relacji pies – właściciel na wyniki prowadzonych badań. Znajduję też pewne niejasności w części metodologicznej, dotyczące np. wykorzystanie „staruszki” do testów, proponuję dokładniejsze opisanie tego eksperymentu. Brakuje mi również odniesienia do literatury przedstawiającej zagadnienie korelacji inteligencji i agresji u psów. Pomimo tych drobnych zastrzeżeń projekt uważam za bardzo interesujący.

Ocena kosztorysu

Kosztorys wydaje się poprawnie zaplanowany, a wszystkie jego pozycje dokładnie zaplanowane. Nie rozumiem jedynie, dlaczego sam kosztorys przedstawiono w języku angielskim, a uzasadnienia poszczególnych części kosztów w języku polskim.

Ocena możliwości wykonania

Proponowane eksperymenty nie wydają się trudne do do przeprowadzenia i wprowadzie testowanych będzie dużo hipotez badawczych, to zaplanowane eksperymenty powinny dać odpowiedzi na wszystkie przedstawione pytania badawcze. W opisie projektu znalazłam informacje o planowanej przynajmniej jednej publikacji. Ze względu na tematykę planowanych badań proponowałabym autorom przemyślnie planowanych publikacji, może warto by wyniki przedstawić również w prasie popularnonaukowej.

Moim zdaniem już na etapie pisania wniosku należy zastanowić się nad konkretnymi konferencjami, gdzie wyniki będą prezentowane.

Proponowałabym jednak ponowne rozważenie wykorzystania współpracy z właścicielami psów, w celu ograniczenia wpływu relacji pies – właściciel na wyniki proponowanych badań.

Mocne strony wniosku

- ciekawy pomysł
- dobrze przedstawione hipotezy badawcze i eksperymenty, które będą je testować
- temat badań łatwy do spopularyzowania naukowego – możliwość trafienia z wynikami do szerszej grupy odbiorców

Słabe strony wniosku

- pewne metodologiczne aspekty, które należałoby ponownie przemyśleć
- braki w przedstawionej literaturze ■

Monika Prus:

Ocena merytoryczna projektu

Projekt zakłada próbę odpowiedzi na pytanie czy ciemne podniebienie u psów warunkuje to, że jest on agresywny i inspirowany jest starym, ludowym porzekadłem. Autorki swoich badań chcą zweryfikować obecnie obowiązujące przypisane do konkretnych ras psów poziomy agresywności. Uważam, że wyniki tych badań będą użyteczne dla hodowców czy lekarzy weterynarii, ale głównie ze względu na próbę weryfikację obecnie przyjętych poziomów agresji. Nie jestem przekonana, czy obalenie bądź potwierdzenie porzekadła ludowego coś zmieni, bo przeciętny Polak bez względu na wynik nadal będzie przywiązany do przysłowia, a osoby na co dzień pracujące ze zwierzętami i tak powinny kierować się doświadczeniem i dostępną wiedzą, a nie przysłowiami. W części dotyczącej celu naukowego projektu brakuje wyszczególnienia szczegółowych celów projektu. Hipoteza b i d powinny być bardziej konkretne. Jeśli zakładamy związek agresji z inteligencją, jak w hipotezie (b) powinno być określone, jaki on jest. Czy będzie on określał fakt, że agresywne psy są inteligentniejsze, czy że mniej agresywne psy takie są? Podobnie w hipotezie (d) – jakiej zmiany poziomu agresji oczekujemy z wiekiem? Kolejną rzeczą jest nadużywanie przez Autorki słowa „korelacja” – ze statystycznego punktu widzenia współczynnik korelacji mierzy się dla związku liniowego, a zerojedynkowy zapis koloru podniebienia, pięciostopniowa skala agresywności to zmienne kategoryczne. Nie możemy na skali liniowej określić odległości, jaka jest pomiędzy podniebieniem jasnym i ciemnym, albo pomiędzy konkretnymi poziomami agresji. Podobnie jest z wyborem testów statystycznych – nie rozumiem dlaczego Autorki zdecydowały się na testy nieparametryczne? Jest to związane z rozkładem danych, którego oczekują? Powinno to być uargumentowane.

Ocena kosztorysu

Kosztorys zaplanowany jest bardzo racjonalnie, jednakże jest kilka rzeczy wymagających poprawek.

Koszt konsultacji z behawiorystą powinien być zawarty w kategorii Wynagrodzenia ze względu na to, że wymagane będzie zawarcie umowy cywilno-prawnej ze specjalistą. Ponadto do pozycji Sprzęt nadaje się tylko kamera, natomiast wszystko inne powinno zostać przeniesione do pozycji Inne koszty bezpośrednio. Błędnie wykalkulowany jest również koszt eksperymentu w I roku realizacji projektu – powinien on wynosić 27 000 zł, a nie 27500 zł. Poza tym w kosztorys wpisany jest udział w konferencjach międzynarodowych, ale nic nie wiadomo na temat tego, ile ich będzie.

Ocena możliwości wykonania

Zaprezentowane w projekcie badania na okres 3 lat są realizowalne. Uważam, że wykorzystanie psów pochodzących od hodowców jest bardzo dobrą decyzją, a fakt że próba będzie heterogenna zostanie zneutralizowany przez dużą próbę. Podobnie, jak ponowne pomiary poziomu agresji u szczeniaków. Wybór kilku ras psów zróżnicowanych pod względem poziomu agresji pozwoli autorkom zbadać ten problem w szerszej skali. Nie jestem przekonana do tak małej różnorodności i ilości planowanych testów. Testy bardziej zróżnicowane dałyby dokładniejszy obraz, a skoro to badania 3-letnie powinno wystarczyć na to czasu.

Mocne strony

- wykorzystanie dużej ilości psów, które będą pochodziły od hodowców (duża próba)
- powtarzalne pomiary poziomu agresji u szczeniaków

Słabe strony

- błędy w kosztorysie i uzasadnieniu kosztów
- mała różnorodność wykonanych testów ■

Hanna Tutaj:

Celem projektu jest sprawdzenie prawdziwości porzekadła mówiącego o związku koloru podniebienia z agresywnością i inteligencją u psów. Niestety w opisie projektu samo powiedzenie nie pada ani razu, więc nie wiadomo dokładnie co autorki chcą weryfikować, trzeba się tego domyślać podczas czytania. Sam pomysł projektu jest ciekawy i dobrze przemyślany. Wyniki badań zainteresowałyby szerokie grono odbiorców, zarówno zajmujących się podłożem zachowań agresywnych u zwierząt, jak i przyszłych hodowców i właścicieli psów.

Uwagi, które nasunęły mi się po przeczytaniu projektu:

- Autorki projektu chcą zweryfikować metodą naukową porzekadło „dotyczące związku ciemnej pigmentacji podniebienia psa i jego agresywnego zachowania”. Nie mówi to czytelnikowi, który nie spotkał się wcześniej z tym porzekadłem o kierunku związku, który ma być badany.
- Autorki projektu stawiają cztery hipotezy. Trzy z nich: (1) związek czarnego podniebienia z poziomem agresji (2) związek agresji z inteligencją i (3) zmiana poziomu agresji z wiekiem nie są wystarczająco sprecyzowane. Znowu brak jest informacji o kierunku zmian.
- Problemem, który ma zostać rozwiązany dzięki projektowi ma być „Szczegółowe zbadanie poziomu agresji u psa, poziomu jego inteligencji oraz inteligencji emocjonalnej z uwzględnieniem zmian zachodzących u psa określonej rasy wraz z wiekiem.” Dyskutowałabym tu nad szczegółowością, jeśli porównujemy ze sobą kolor podniebienia i zachowanie psów.
- Zaletą projektu jest wybór trzech ras psa, u których podejrzewa się różne poziomy agresji. Również badanie zmian zachodzących u psa wraz z wiekiem jest ciekawym pomysłem, jednak należałoby wyniki takich analiz porównać ze sobą.
- Nie do końca rozumiem wybór testów statystycznych, jak i używanie w tekście słowa korelacja, skoro mówimy o zmiennej kategorycznej, jaką jest kolor podniebienia ciemny i jasny i pięciostopniowej skali agresji.
- Wyniki projektu mogą mieć znaczenie zarówno dla lekarzy weterynarii, hodowców zwierząt, jak i potencjalnych właścicieli psów, co jest wyczerpująco i przekonująco opisane.
- Autorki piszą o braku ryzyka związanego z terminową realizacją zadań badawczych, lecz określają jak

- czasochłonne proponowane badania dopiero w uzasadnieniu zaplanowanych kosztów.
- Czy w pytaniu I formularza dla właścicieli psów, dotyczącym charakteru zwierzęcia, wystarczającym jest przyporządkowanie psa do dwóch kategorii (łagodny lub agresywny)? Może należałoby wziąć pod uwagę fakt, że opinia właściciela jest subiektywna, a dane zachowania nie przez każdego mogłyby zostać uznane za agresywne/łagodne?
- Koszt eksperymentu w pierwszym roku wynosi 27000 PLN, a nie 27500. Dodatkowo, skoro na tenże składa się m. in. koszt zabawki, to umieszczanie ponownie kosztu zabawek w kosztach sprzętu nie jest poprawne. Ponadto, zabawki, miski, karma, smycze dla psów, jak i rękawice nie są sprzętem. Konsultacja z behawiorystą powinna odbyć się na zasadzie umowy cywilno-prawnej, co kwalifikuje ją jako wynagrodzenie. W jaki sposób zebrane zostaną od właścicieli informacje dotyczące psów? Jeśli w formie papierowego formularza, to należałoby uwzględnić koszty materiałów biurowych.
- Z 14 pozycji literaturowych tylko 4 zostały wydane po roku 2000, a 2 w ciągu ostatnich 10 lat. Czy badania tego typu są bardzo rzadko prowadzone? Czy po prostu nie udało się dotrzeć do nowszej literatury?
- Tekst projektu jest przejrzysty i nieliczne stylistycznie potknięcia, jak „kłapanie paszczą” czy „poziom agresji u pasa” nie utrudniają jego zrozumienia, jednak należałoby je poprawić.

Projekt jest interesujący, a poruszane zagadnienie ciekawe. Po odpowiednich poprawkach rekomendowałabym finansowanie ■

Katarzyna Woch:

Streszczenie

- streszczenie projektu zawiera za mało informacji dotyczących metodologii planowanych eksperymentów,
- cel projektu zakładający sprawdzenie wpływu koloru podniebienia na agresję u psów oraz jego znaczenie dla hodowców psów oraz weterynarzy są w klarowny sposób przedstawione,
- w niesatysfakcjonujący sposób przedstawiony jest powód badań korelacji agresji z inteligencją;

Cel naukowy

- cele postawione sobie przez autorki projektu zostały przedstawione w sposób przejrzysty, aczkolwiek wydaje mi się, że dysponują one argumentami z literatury, który pozwoliłyby im na sformułowanie bardziej konkretnych hipotez. Bardziej szczegółowe hipotezy sprawiłyby wrażenie, że autorki dobrze znają się na temacie i można im zaufać w kwestii rozwiązywania zaproponowanego przez nie problemu;

Znaczenie projektu

- w tekście zostaje przytoczone porzekadło mówiące o zależności poziomu agresywności od koloru podniebienia u szczeniąt, jednakże autorki zignorowały fakt, że nie każdy czytelnik może być z tymże porzekadłem zaznajomiony. Uważam, że powinny umieścić tam bardziej szczegółowy opis tego powiedzenia, żeby nie było wątpliwości, jaki kolor podniebienia rzekomo wpływa na jakie zachowanie,
- przedstawiony został obecny stan wiedzy i wyniki dotychczasowych badań z zakresu biochemii mogące sugerować, że testowane przez autorki powiedzenie jest czymś więcej niż mitem, aczkolwiek nigdzie nie zostało jasno zakomunikowane, że pomimo naukowych przesłanek nie istnieją badania, które zgłębiałyby temat,
- wyszczególniony został powód, dla którego wyniki zaproponowanego projektu będą przydatne dla społeczności hodowców psów oraz interesujące z punktu widzenia popularnonaukowego,
- autorki nie uwzględniły w znaczeniu projektu aspektu badania inteligencji psów i korelowania jej z zachowaniami agresywnymi – czy to oznacza, że nie wnoszą nic do obecnego stanu wiedzy i informacje nie będą nikomu przydatne?

Koncepcja i plan badań

- plan badawczy został przedstawiony w wystarczająco szczegółowy sposób,
- uważam, że kwestia rozróżnienia badanej przez autorki inteligencji oraz inteligencji emocjonalnej powinna zostać w szerszy sposób wytłumaczona – dlaczego skupiają się na inteligencji emocjonalnej i w jaki sposób jest to uargumentowane ich koncepcją badań?

Metodyka badań

- metody są opisane w sposób precyzyjny, każdy element projektu jest wyszczególniony z uwzględnieniem wszystkich przeprowadzanych procedur. W przypadku metod nieautorskich, zaczerpniętych z literatury, cytacje zostały przedstawione,
- wydaje mi się, że określenie "kłapanie paszczą" jest za bardzo kolokwialne, aby używać go w opisie projektu,
- zastanawiam się dlaczego autorki zdecydowały się na analizę statystyczną testami U Manna-Whitneya oraz Kruskala-Wallis, a nie innymi testami,
- oczekiwałabym dokładniejszych informacji dotyczących analizy statystycznej takich eksperymentów;

Kosztorys

- autorki niepoprawnie zakwalifikowały sprzęt w kosztorysie (z wymienionych przedmiotów tylko kamera jest rzeczywiście "sprzętem"),
- finalna kwota nie zgadza się;

Uwagi ogólne

Projekt został zaplanowany w sposób przemyślany, zarówno pod względem metodologicznym jak i koncepcyjnym. Wyniki badań powinny okazać się przydatną informacją dla konkretnego grona odbiorców (hodowcy psów, weterynarze). Proponowałabym szersze wytłumaczenie, dlaczego oprócz eksperymentu związanego z obaleniem mitu o zależności poziomu agresji od koloru podniebienia, autorki zdecydowały się na przeprowadzenie eksperymentu sprawdzającego korelację agresywności z inteligencją. Niemniej jednak uważam, że sam pomysł badań jest bardzo ciekawy i bardzo chętnie zapoznam się z wynikami ■

Kamila Zajac:

Ocena merytoryczna projektu

Prezentowany projekt porusza ciekawy temat dotyczący wykrycia czy istnieje zależność pomiędzy ciemnym ubarwieniem podniebienia psa domowego a poziomem obserwowanej agresji. Wnioskodawczyni podczas realizacji badań będą starały się odpowiedzieć na pytanie, czy ludowe powiedzenie ma swoje uzasadnienie naukowe, co pozwoli stwierdzić czy pies o ciemnym podniebieniu będzie agresywny.

Cel prezentowanego projektu jest jasny, jednak należałoby oczekiwać, że przedstawione hipotezy badawcze będą bardziej precyzyjne. Mocną stroną wniosku jest właściwy wybór modeli badawczych oraz badanie psów będących w różnym wieku. Wnioskodawczyni wykazały się znajomością literatury, wyczerpująco opisały testy jakie będą stosować.

Wniosek spełnia kryterium badań podstawowych, jednak wyniki mogą mieć wpływ na rozwój nauki ponieważ uzyskane dane przyczynią się do zwiększenia stanu wiedzy dotyczącej poziomu agresji u poszczególnych ras psów w kontekście ich hodowli lub potencjalnego przysposobienia. Niekompletne wydają się informacje dotyczące użycia konkretnych testów statystycznych, sugerowałabym uzasadnienie dlaczego wnioskodawczyni zdecydowały się na te konkretne.

Uważam, że zaprezentowany projekt jest dobry, a realizacja badań umożliwi uzyskanie wyników, które będą mogły być opublikowane w czasopiśmie specjalistycznym. Wnioskodawczyni powinny zastanowić się, czy nie warto do formularza dodać dodatkowego pytania dotyczącego kryteriów określenia czy pies jest łagodny czy agresywny, ponieważ jedno pytanie może nie być wystarczające do obiektywnej

oceny.

Ocena kosztorysu

Mocną stroną przygotowanego kosztorysu jest fakt, że zawiera przedstawione w bardzo szczegółowy sposób wydatki planowane w poszczególnych latach trwania projektu. Planowane koszty są uzasadnione, jednak można odnaleźć kilka istotnych błędów m.in. dotyczących kwalifikacji poszczególnych wydatków do odpowiednich kategorii, np. w kontekście wynagrodzenia lub aparatury.

Ocena możliwości wykonania

Wnioskodawczynie wykazały się znajomością literatury, co potwierdza że są w stanie wykonać zaprezentowany projekt w planowanym czasie. Uzyskane dane będą szczególnie przydatne dla hodowców psów i techników weterynarii. Dobrym założeniem projektu jest współpraca z właścicielami psów.

Mocne strony wniosku

- ciekawy temat, dostarczy nowych danych, pozwoli wypełnić lukę w wiedzy,
- dobra znajomość tematu wnioskodawczyń przedstawiona wyczerpująco poprzez powołanie się na konkretne prace naukowe,
- jasno sformułowany cel wniosku,

Słabe strony wniosku

Niektóre z zaplanowanych wydatków powinny znaleźć się w innych kategoriach, na przykład do kategorii aparatury (sprzętu) nie możemy włączyć zabawek, miski, smyczy itd. ponieważ są to materiały zużywalne, także konsultacja behawiorysty powinna być uwzględniona w kategorii wynagrodzenia. Nie jest uzasadnione dlatego wymienione testy statystyczne zostaną wykorzystane do analizy danych. Bardzo ogólnie postawione hipotezy badawcze ■

FINALNA WERSJA PROJEKTU ■

CIEMNE PODNIEBIENIE U SZCZENIĄT I DOROSŁYCH OSOBNIKÓW DUŻYCH RAS PSÓW DOMOWYCH CANIS FAMILIARIS L. JAKO WSKAŹNIK AGRESYWNOSCI I INTELIGENCJI – – PRAWDA, CZY MIT?

AUTORZY:

Anna Gądek, Agnieszka Janas, Paulina Wietrzyk

STRESZCZENIE PROJEKTU:

Miłośnicy psów wciąż opierają się na niezweryfikowanych metodą naukową informacjach związanych z zachowaniami czworonogów. Najlepszym przykładem jest stereotyp dotyczący związku ciemnej pigmentacji podniebienia psa i jego agresywnego zachowania.

Badania prowadzone będą na trzech rasach psów: labrador retriever, owczarek niemiecki, amerykański pitbull terrier, w trzech etapach obejmujących następujące zagadnienia: (I) Czy ciemny kolor podniebienia wpływa na wysoki poziom agresywności? (II) Czy psy o wysokim poziomie agresywności cechować się będą wysokim poziomem inteligencji, przy czym osobniki o wyższym poziomie inteligencji emocjonalnej nie będą wykazywać zachowań agresywnych wobec swojego właściciela? (III) Czy poziom agresywności u psa zmienia się wraz z wiekiem? W projekcie zaplanowano przebadanie 240 psów (80 osobników w obrębie jednej rasy) z wyodrębnieniem dwóch kategorii wiekowych: psy dwumiesięczne i dwudziestomiesięczne. Początkowo badania polegać będą na zebraniu informacji na temat psa od jego właściciela. Następnie planowane jest wykonanie dwóch testów oceniających poziom agresywności u

poszczególnych psów, testu oceniającego psią inteligencję oraz dwóch testów dotyczących inteligencji emocjonalnej osobnika.

Zebrane dane zostaną przeanalizowane, a uzyskane wyniki przyczynią się do zwiększenia stanu wiedzy dotyczącej poziomów: agresywności, inteligencji oraz inteligencji emocjonalnej u poszczególnych ras psów w aspekcie hodowli, kupna lub adopcji psa.

1. Cel naukowy projektu ■

Głównym celem naukowym projektu jest znalezienie odpowiedzi na pytanie: czy ciemne podniebienie u szczeniąt psa domowego (*Canis familiaris* L.) jest wskaźnikiem późniejszej agresywności oraz inteligencji u dorosłych osobników psów dużych ras.

Projekt ten umożliwi weryfikację hipotez zakładających, że:

- (a) psy z czarnym podniebieniem wykazują wysoki poziomem agresywności;
- (b) psy wykazujące wysoki poziom agresywności charakteryzują się wysokim poziomem inteligencji;
- (c) psy o wyższym poziomie inteligencji emocjonalnej nie wykazują agresywnych zachowań wobec swojego właściciela;
- (d) poziom agresywności u psa zmienia się wraz z wiekiem.

Oczekiwanym rezultatem jest określenie poziomu agresywności, inteligencji oraz inteligencji emocjonalnej u badanych osobników, a także weryfikacja dotychczasowych poziomów agresywności u badanych ras (labrador retriever, owczarek niemiecki, amerykański pitbull terrier).

2. Znaczenie projektu ■

Od wieków tytułem najlepszego przyjaciela człowieka mianowany był pies. W świetle tego relacja pies-człowiek może być postrzegana jako rodzaj symbiozy (Rindos i in. 1980). Szczególnie istotna wydaje się być konwergencja zachowań społecznych obserwowanych u psów wobec ludzi w powiązaniu z ludzkimi zachowaniami społecznymi. Odczytywanie ludzkich zachowań przez zwierzęta i ich emocjonalna więź z człowiekiem jest określana mianem inteligencji emocjonalnej (Howell i in. 2013). Nie tak dawno zwrócono uwagę na znacznie bardziej efektywne odczytywanie ludzkich zachowań przez psy niż u blisko spokrewnionych z człowiekiem ssaków naczelnych (Hare i Tomasello 2005, Howell i in. 2013). Tłumaczy to także powszechne wykorzystywanie psów w służbie człowiekowi oraz dużą popularność czworonogów jako domowych pupili. Pod tym względem szczególnie pożądanymi cechami psiej osobowości jest towarzyskość i figlarność (Svartberga and Forkmanb 2002). Pomimo faktu, że w każdym zakątku Ziemi, gdzie obecny jest człowiek, towarzyszy mu pies, z perspektywy badawczej nie cieszy się on dużą popularnością (Hare i Tomasello 2005). Co gorsza, miłośnicy psów wciąż opierają się na niezweryfikowanych metodą naukową informacjach związanych z zachowaniami czworonogów. Najlepszym przykładem jest stereotyp dotyczący związku ciemnej pigmentacji podniebienia psa z jego agresywnym zachowaniem. Agresja jest nieodzownym elementem psiego zachowania, ponadto w literaturze istnieją przesłanki dotyczące związku pomiędzy agresywnością i inteligencją psa (Casey i in. 2013). Niemniej jednak u niektórych osobników poziom zachowań agresywnych może być na tyle wysoki, że nie będzie on akceptowalny przez człowieka.

Typ i poziom agresywności psiego temperamentu warunkowane mogą być wieloma czynnikami środowiskowymi, jak również genetycznymi (Netto i Plana 1997, Casey i in. 2013, Lord i in. 2014). Ostatni czynnik jest szczególnie istotny w świetle zaproponowanego tematu badań, którego wynik pozytywny wskazywałby na fenotypowy przejaw genotypu warunkującego agresywne zachowanie. Przeprowadzone dotychczas badania dotyczące pigmentacji wewnątrz jamy ustnej psów (m.in. warg, języka) były najczęściej związane ze zmianami patologicznymi, charakterystycznymi dla chorób nowotworowych czworonogów (Dummett i in. 1964). Fizjologiczne podłoże pigmentacji nabłonka i skóry psów ma związek z depozycją w komórkach barwnika – melaniny (Dummett i Barends 1978). Informacji na temat powiązania produkcji melaniny ze szlakami metabolicznymi na chwilę obecną dostarczają jedynie badania prowadzone na hodowli lisów, mające na celu odpowiedni dobór krzyżowanych osobników z intencją otrzymania potomstwa o jak najbardziej łagodnym usposobieniu (Goldman 2010). W badaniu tym odnotowano zmiany dotyczące

zabarwienia skóry w zależności od poziomu hormonu adrenaliny. Wyniki te wskazują na modyfikującą rolę adrenaliny na biochemiczny szlak melaniny (Goldman 2010). Jednakże badania prowadzone przez Conroy i Beamer (1970) wskazują na odmienne szlaki depozycji melaniny w skórze i jamie ustnej. Zagadnienie to wydaje się szczególnie istotne w odniesieniu do osobników reprezentujących rasy o skrajnie odmiennym temperamencie, wśród których występują osobniki o jasnej i ciemnej pigmentacji podniebienia (obserwacje własne).

Efektom badań planowanych w niniejszym projekcie będzie rzetelna informacja dla hodowców oraz osób zainteresowanych kupnem lub adopcją psa o predyspozycjach czworonoga do przejawiania łagodnego lub agresywnego usposobienia. Porównanie osobników reprezentujących rasy różniące się temperamentem posłuży do weryfikacji dotychczas postulowanego poziomu agresywności w obrębie badanych ras. W projekcie przewidywane jest, że psy o czarnym podniebieniu nie będą wykazywały wysokiego poziomu agresywności, przez co przestaną być one dyskryminowane podczas wyboru przez potencjalnego właściciela. Ponadto, psy o wysokim poziomie zachowań agresywnych cechować się będą wysokim poziomem inteligencji, przy czym osobniki o wyższym poziomie inteligencji emocjonalnej nie będą wykazywać zachowań agresywnych wobec swojego właściciela. Dodatkowo, spodziewanym jest, że poziom agresywności u psa będzie ulegać zmianie wraz z wiekiem.

Wyniki zostaną opublikowane w trzech niezależnych częściach w czasopismach z listy JCR w systemie Open Access. Odpowiednio opracowane zbiorcze wyniki posłużą do sporządzenia artykułu popularnonaukowego, który przybliży badane zagadnienie społeczeństwu.

3. Koncepcja i plan badań ■

Podstawowa koncepcja: Projekt zakłada badania nad poziomem agresywności u psa, który często bezpodstawnie wiązany jest z czarnym kolorem psiego podniebienia. Ponadto istnieją badania wiążące wyższy poziom agresywności z wysokim poziomem psiej inteligencji. Prezentowany projekt ma na celu nie tylko sprawdzenie zasadności stwierdzenia dotyczącego związku barwy podniebienia z agresywnością, ale także zweryfikowanie słuszności hipotezy zakładającej, że pomimo wysokiego poziomu agresywności psy o wyższym poziomie inteligencji emocjonalnej nie będą atakowały właściciela.

Problem do rozwiązania: Zbadanie poziomu agresywności u psa, poziomu jego inteligencji oraz inteligencji emocjonalnej z uwzględnieniem zmian zachodzących u psa określonej rasy wraz z wiekiem.

Zarys planu projektu

Projekt będzie realizowany w trzech etapach. W każdym z etapów dane zbierane będą w obrębie trzech ras psów domowych (80 osobników reprezentujących daną rasę):

Etap I. Czy ciemny kolor podniebienia wpływa na wysoki poziom agresywności?

Zbiór danych – przebadanych zostanie 120 osobników dorosłych z podziałem na trzy rasy oraz dwie kategorie barwy podniebienia: jasna; ciemna.

- Pozyskanie danych od właściciela przy użyciu formularzy z wynikami w pięciostopniowej skali Godmann'a.
- Pozyskanie danych przy pomocy dwóch testów, przeprowadzanych w warunkach kontrolowanych, o różnym stopniu stymulacji określających poziom agresji psa w pięciostopniowej skali Godmann'a.

Analiza danych – określenie czy kolor podniebienia psa wpływa na poziom jego agresywności: jednoczynnikowa analiza wariancji ANOVA; zbadanie różnicy dotyczącej poziomów agresywności pomiędzy danymi pochodzącymi z testów, a danymi uzyskanymi od właścicieli: test t-Studenta.

Etap II. Czy psy o wysokim poziomie agresywności cechować się będą wysokim poziomem inteligencji, przy czym osobniki o wyższym poziomie inteligencji emocjonalnej nie będą wykazywać zachowań agresywnych wobec swojego właściciela?

Zbiór danych – przebadanych zostanie 120 osobników dorosłych z podziałem na trzy rasy.

- Pozyskanie danych przy pomocy testu na inteligencję oraz testu na inteligencję emocjonalną.

Analiza danych – określenie czy inteligencja oraz inteligencja emocjonalna psa wpływają na poziom jego agresywności: dwuczynnikowa analiza wariancji ANOVA.

Etap III. Czy poziom agresywności u psa zmienia się wraz z wiekiem?

Zbiór danych – przebadanych zostanie 120 osobników młodych z podziałem na trzy rasy w dwóch seriach badań: w wieku dwóch miesięcy i po czterech miesiącach od wykonania pierwszych testów.

- Pozyskanie danych przy pomocy dwóch testów, przeprowadzanych w warunkach kontrolowanych, o różnym stopniu stymulacji określających poziom agresji psa w pięciostopniowej skali Godmann'a.

Analiza danych – określenie czy wiek psa wpływa na poziom jego agresywności: jednoczynnikowa analiza wariancji ANOVA.

Ocena ryzyka: Brak ryzyka związanego z terminową realizacją wszystkich zadań badawczych projektu.

4. Metodyka badań ■

Dobór psów – ze względu na trudność rozróżnienia zachowań agresywnych pomiędzy osobnikami psów, w badaniu bierzemy pod uwagę zachowania wobec człowieka. Badane będą psy dorosłe oraz szczenięta wychowywane przez prywatnych właścicieli. Właściciel może posiadać tylko jednego psa (psy nie uczą się zachowań od siebie nawzajem) nieprowadzonego przez wykwalifikowanych treserów. Badane będą trzy rasy psów dobierane zgodnie z klasami agresji wg Polsky (1984): (1) labrador retriever – rasa nieagresywna; (2) owczarek niemiecki – rasa pośrednia; (3) amerykański pitbull terrier – rasa agresywna.

Każdy z badanych psów musi posiadać rodowód potwierdzony certyfikatem. Łącznie przebadanych zostanie 80 osobników jednej rasy z uwzględnieniem koloru podniebienia (jasne/ciemne) oraz kategorii wiekowej:

- psy dorosłe dwudziestomiesięczne – 40 osobników;
- szczeniaki dwumiesięczne – 40 osobników.

Miejsce badań i elementy bezpieczeństwa – testy wykonywane będą w pomieszczeniu zamkniętym co lepiej pozwoli kontrolować warunki i sytuację, w której pies będzie stymulowany (Netto & Plana 1997). Właściciel psa będzie zobligowany do przyniesienia ulubionej karmy dla psa oraz psiego legowiska lub koca, które będzie ustawione w jednym z kątów pomieszczenia doświadczalnego, co przyczyni się do zapewnienia poczucia bezpieczeństwa, stworzenia miejsca odpoczynku, a także wystąpienia zjawiska obrony terytorialnej. Każdy pies przed wykonaniem testów będzie spędzał ze swoim właścicielem w pomieszczeniu badawczym ok. 30 minut w celu aklimatyzacji. W przypadku problemów zaklimatyzacją badanie zostanie przerwane. Z uwagi na bezpieczeństwo w czasie wykonywania testów pies zostanie zapięty na długiej smyczy, niekrępującej jego ruchów. Osoba testująca otrzyma wskazówki jak blisko może podejść względem stymulowanego psa w zależności od testu. Zachowanie psa będzie obserwowane oraz nagrywane.

Dane pochodzące od właściciela – zebranie informacji dotyczących psa na podstawie opinii właściciela w oparciu o formularz z pytaniami:

1. Czy uważa Pan/Pani, że pies jest: (a) łagodny; (b) agresywny.
2. Czy w przeciągu ostatniego miesiąca pies wykazywał któreś z poniższych zachowań (wielokrotny wybór): (1) brak agresji, (2) warczenie, (3) pokazywanie zębów oraz warczenie, (4) kłapanie pyskiem, (5) atak z intencją ugryzienia lub ugryzienie.

Dane pozyskane z testów – wyniki testów notowane będą w formularzach badawczych:

a. poziom agresywności u psa (właściciel znajduje się poza strefą prowadzenia testów): ocena agresji psa określana będzie na podstawie testów behawioralnych w oparciu o 5-cio stopniową skalę Gutmann'a (DeVellis 1991): (1) brak agresji, (2) warczenie, (3) pokazywanie zębów oraz warczenie, (4) kłapanie pyskiem, (5) atak z intencją ugryzienia lub ugryzienie. W czasie testów odnotowany będzie najwyższy wynik osiągnięty przez psa. Zastosowany zostanie:

- test zachowania w obecności obcej osoby natrętnie wpatrującej się w psa i mówiącej chrypliwym głosem o wysokiej tonacji. Osoba ta jest niedbale ubrana i zbliża się do psa z laską, próbując go pogłaskać używając rękawicy ochronnej (Winkler 1977);
- test zachowania w obecności obcej osoby krzyczącej, klaskającej, zbliżającej się do psa i wykonującej ruchy

o charakterze uderzenia i kopania w jego kierunku (brak bezpośredniego kontaktu fizycznego) (Wright 1985).

W celu określenia czy kolor podniebienia psa wpływa na poziom jego agresywności zastosowana zostanie jednoczynnikowa analiza wariancji ANOVA, natomiast aby sprawdzić czy istnieją różnice dotyczące poziomów agresywności pomiędzy danymi pochodzącymi z testów, a danymi uzyskanymi od właścicieli wykonany zostanie test t-Studenta.

b. poziom inteligencji emocjonalnej psa (sprawdzenie agresji względem właściciela i obcej osoby; właściciel znajduje się poza strefą prowadzenia badań w przypadku testu z osobą obcą). Ocena agresji psa określana będzie na podstawie testów behawioralnych w oparciu o 5-cio stopniową skalę Gutmann'a (DeVellis 1991). W czasie testów odnotowany będzie najwyższy wynik osiągnięty przez psa:

- test zachowania w przypadku zabierania miski z ulubionym jedzeniem przez właściciela (Wijk and Klasen 1981);

- test zachowania w przypadku zabierania miski z ulubionym jedzeniem przez osobę obcą (Wijk and Klasen 1981).

c. poziom inteligencji u psa: Reakcja psa widzącego odbicie właściciela w lustrze oceniana wg trzy stopniowej skali: 1 – pies mało inteligentny (zainteresowanie odbiciem w lustrze); 2 – pies przeciętnie inteligentny (pies niezdecydowany); 3 – pies inteligentny (ruch w kierunku właściciela):

- test lustra (Howell i Bennett 2011).

W celu określenia czy inteligencja oraz inteligencja emocjonalna psa wpływają na poziom jego agresywności oraz czy wiek psa wpływa na poziom jego agresywności wykonana zostanie dwuczynnikowa analiza wariancji ANOVA.

Przeprowadzone testy mają za zadanie obiektywnie ocenić zachowanie psa, co w porównaniu z danymi uzyskanymi poprzez formularz wypełniany przez właściciela psa będzie stanowiło dla niego informację zwrotną o temperamencie pupila.

5. Literatura ■

Casey R.A., Loftus B., Bolster C., Richards G.J., Blackwell E.J. 2013. *Inter-dog aggression in a UK owner survey: prevalence, co-occurrence in different contexts and risk factors.* *Veterinary Record* 172(5): 127.

Conroy J.D., Beamer P.D. 1970. *The Development of Cutaneous and Oral Pigmentation in Labrador Retriever Fetuses (Canis familiaris).* *Journal of Investigative Dermatology* 54(4): 304–315.

Lord K., Coppinger L., Coppinger R. 2014. *Differences in the behavior of landraces and breeds of dogs.* In: T. Grandin, M.J. Deesing (eds.) *Genetics and the Behavior of Domestic Animals.* Colorado State University, USA, 496 pp.

DeVellis R.F. 1991. *Scale Development: Theory and Applications.* Sage Publications, Newbury Park, 121 pp.

Dummett C.O., Blackledge G.T., Bolden T.E. 1964. *Oral pigmentation in canis familiaris.* *Journal of Periodontology* 35(5): 416–423.

Dummett C.O., Barends G. 1978. *Animal o pigmentation.* *Journal ral Peridontology* 49(4): 206–213.

Goldman J.G. 2010. *Man's new best friend? A forgotten Russian experiment in fox domestication.* *Scientific American Blog.* Dostęp on-line: 9.04.2017.

Hare B., Tomasello M. 2005. *Human-like social skills in dogs?* *Trends in Cognitive Sciences* 9(9): 439–444.

Howell T.J., Bennett P.C. 2011. *Can dogs (Canis familiaris) use a mirror to solve a problem?* *Jurnal of Veterinary Behavior: Clinical Applications and Research* 6(6): 306–312.

Howell T.J., Toukhsati S., Conduit R., Bennett P. 2013. *The perceptions of dog intelligence and cognitive skills survey.* *Journal of Veterinary Behavior: 1-7* (in press).

Netto W.J., Planta D.J.U. 1997. *Behavioural testing for aggression in the domestic dog.* *Applied Animal Behaviour Science* 52: 243–263.

Polsky R.H. 1984. *Factors influencing aggressive behaviour in dogs.* *Australian Veterinary Practice* 14(2): 66–69.

Rindos D., Aschmann H., Bellwood P., Ceci L., Cohen M.N., Hutchinson J., Santley R.S., Shaffer J.G., Shaw T. 1980. *Symbiosis, Instability, and the Origins and Spread of Agriculture: A New Model [and Comments and Reply].* *Current Anthropology* 21(6): 751–772.

Svartberga K., Forkman B. 2002. *Personality traits in the domestic dog (Canis familiaris)*. Applied Animal Behaviour Science 79: 133–155.

Wijk J., Klasen H.J. 1981. *Hondebeten en de omstandigheden waaronder ze vobrkomen*. Ned Tydschr Geneesk 125(4): 133–136.

Winkler W.G. 1977. *Human Deaths Induced by Dog Bites, United States, 1974–75*. Public Health Report 92(5): 425–429.

Wright J.C. 1985. *Severe attacks by dogs: characteristics of the dogs, the victims, and the attack settings*. Public Health Report 100(1): 55.

Kosztyorys ■

Pozycja	Koszty w poszczególnych latach			Suma
	2018	2019	2020	
1. Koszty bezpośrednie, w tym:	75 100 zł	91 500 zł	64 000 zł	230 600 zł
1/ Wynagrodzenia	36 000 zł	36 000 zł	36 000 zł	108 000 zł
2/ Aparatura	2 150 zł	0 zł	0 zł	2 150 zł
3/ Inne koszty bezpośrednie	36 950 zł	55 500 zł	28 000 zł	120 450 zł
2. Koszty pośrednie	13 080 zł	18 300 zł	12 800 zł	45 690 zł
Suma kosztów (1+2)	88 180 zł	109 800 zł	76 800 zł	276 290 zł

Uzasadnienie kosztów ■

I ROK (2018)

Wynagrodzenie dla wykonawców projektu

- miesięczne wynagrodzenie dla trzech osób w wysokości 1 000.00 zł (3 osoby x 1 000.00 zł x 12 m-cy) – 36 000.00 zł

Inne koszty bezpośrednie

- materiały potrzebne do eksperymentów: zabawki do testu na inteligencję emocjonalną 6 000.00 zł (240 sztuk x 25 zł); miski dla psa: 200.00 zł (10 x 20.00 zł); smycze: 300.00 zł (15 x 20.00 zł); rękawice ochronne: 1 000.00 zł (5 x 200.00 zł); karma: 50.00 zł (5 kg); materiały biurowe: 500.00 zł
- koszt eksperymentu: 27 000.00 zł (120 osobników x 225.00 zł/osobnik*)
- pozycjonowanie strony internetowej: 400.00 zł
- konsultacja behawiorysty: 1 500.00 zł

Koszty sprzętu

- sprzęt potrzebny do eksperymentów: dwie kamery 2 000.00 zł (2 x 1 000.00 zł); lustro do testu na inteligencję: 150.00 zł

II ROK (2019)

Wynagrodzenie dla wykonawców projektu

- miesięczne wynagrodzenie dla trzech osób w wysokości 1 000.00 zł (3 osoby x 1 000.00 zł x 12 m-cy) – 36 000.00 zł

Inne koszty bezpośrednie

- koszt eksperymentu: 54 000.00 zł (240 osobników x 225.00 zł/osobnik*)
- konsultacja behawiorysty: 1 500.00 zł

III ROK (2020)

Wynagrodzenie dla wykonawców projektu

- miesięczne wynagrodzenie dla trzech osób w wysokości 1 000.00 zł (3 osoby x 1 000.00 zł x 12 m-cy) – 36 000.00 zł

Inne koszty bezpośrednie

- koszt korekty językowej: 3 000.00 zł
- koszty publikacji w renomowanych czasopismach: jeden w systemie Open Access w Journal of Veterinary Behavior: Clinical Applications and Research: 10 000.00 zł, pozostałe dwa w standardowej, bezkosztowej formie publikacji w czasopismach: Veterinary Record, Veterinary Medicine-Science and Practice.

- koszt udziału w konferencji międzynarodowej Annual Conference of the Animal Behavior Society: 15 000.00 zł

* koszt w przeliczeniu na przebadanie jednego psa zawiera koszt zryczałtowanego wynagrodzenia (dojazd właściciela z psem na miejsce badania).





CZYNNIKI WPŁYWAJĄCE NA OCENĘ WŁASNEJ MASY CIAŁA ORAZ POSTRZEGANIE MASY CIAŁA U INNYCH KOBIEC

PIERWOTNA WERSJA PROJEKTU ■

CZYNNIKI WPŁYWAJĄCĘ NA OCENĘ WŁASNEJ MASY CIAŁA ORAZ POSTRZEGANIE MASY CIAŁA U INNYCH KOBIEC

AUTORZY:

Ewa Bobulska, Martyna Żurawiecka i Magdalena Żywicka

STRESZCZENIE PROJEKTU:

Postrzeganie własnej masy ciała może być predyktorem skłonności do wystąpienia zaburzeń odżywiania oraz otyłości. Ponadto wykazano jego wpływ na atrakcyjność kobiet. Problem nieprawidłowej estymacji własnej masy ciała jest raportowany w publikacjach z wielu krajów całego świata. Przykładowo wśród kobiet meksykańskich, gdzie aż 40% nie ocenia jej trafnie. W USA aż 66% kobiet wprost deklaruje niezadowolenie ze swojej masy ciała. Celem badań jest sprawdzenie czy występuje zależność pomiędzy wybranymi czynnikami, a oceną masy ciała własnej oraz innych kobiet. Badania przeprowadzone zostaną na terenie Polski wśród kobiet w wieku 20-79 lat. Informacje uzyskane pochodzą będą z kwestionariusza oraz pomiarów wybranych cech antropometrycznych. Zostaną także wyliczone podstawowe wskaźniki dla oceny prawidłowości masy ciała i lokalizacji tkanki tłuszczowej. Projekt pozwoli zebrąć wystarczającą ilość danych do ustalenia jak duży odsetek kobiet w Polsce nieprawidłowo estymuje masę ciała i czy jest to związane z błędnym postrzeganiem sylwetek innych kobiet. Ponadto ważnym aspektem jest zwrócenie uwagi na rolę prawidłowej oceny masy ciała w prewencji zaburzeń odżywiania oraz otyłości. Problem błędnej oceny masy ciała wpływa również negatywnie na postrzeganie atrakcyjności kobiety. Dlatego też samoocena może wpływać pośrednio na sukces reprodukcyjny.

1. Cel naukowy projektu ■

Błędna ocena własnej masy ciała może prowadzić zarówno do zaburzeń odżywiania, jak i otyłości [10, 9]. Celem naukowym projektu jest sprawdzenie czy istnieje zależność pomiędzy oceną własnej masy ciała i postrzeganiem masy ciała u kobiet, a wybranymi czynnikami.

Postawiono następujące pytania badawcze:

- Czy istnieje zależność pomiędzy oceną własnej masy ciała, a postrzeganiem masy ciała u innych kobiet?
- Czy status społeczno-ekonomiczny, wiek i poziom aktywności fizycznej mają wpływ na ocenę własnej masy ciała i postrzeganie masy ciała u innych kobiet?
- Czy różne typy sylwetki są odmiennie postrzegane pod względem estymacji masy ciała?

W celu odpowiedzi na te pytania sformułowano pięć hipotez badawczych:

- U pewnej grupy kobiet istnieje zależność pomiędzy oceną własnej masy ciała, a estymacją masy ciała u innych kobiet.
- Zależność pomiędzy oceną własnej masy ciała, a estymacją masy ciała u innych może

- świadczyć o niewłaściwej percepcji tego aspektu.
- Brak zależności pomiędzy oceną własnej masy ciała, a estymacją masy ciała u innych może świadczyć o psychologicznym podłożu zjawiska.
- Status społeczno-ekonomiczny, wiek i poziom aktywności fizycznej mają wpływ na ocenę własnej masy ciała i postrzeganie masy ciała innych.
- Różne typy sylwetki są odmiennie postrzegane pod względem estymacji masy ciała.

2. Znaczenie projektu ■

Zaburzenia odżywiania są coraz powszechniejszym zjawiskiem, z kolei otyłość stanowi jeden z głównych problemów zdrowotnych XXI wieku. Już w 1997 roku została ona uznana przez WHO za chorobę cywilizacyjną [1]. Ministerstwo Zdrowia Wielkiej Brytanii szacuje, że jeśli aktualny trend zostanie utrzymany do roku 2050 średnia długość życia ulegnie skróceniu o pięć lat [1]. Z tego względu niezwykle ważna jest prewencja rozpowszechniania się obu problemów w społeczeństwie. Niewłaściwa ocena własnej masy ciała może prowadzić do obu tych schorzeń [9], co skłania do przemyślenia czy kontrola samooceny nie powinna zostać jednym z elementów programów prewencyjnych. Postuluje się, iż właściwa percepcja własnego ciała wpływa na uzyskanie oraz utrzymanie prawidłowej masy ciała [14]. Badania longitudinalne potwierdziły, iż kobiety w średnim wieku, które właściwie postrzegają swoje ciało częściej kontynuują wzmożoną aktywność fizyczną, dzięki czemu utrzymują BMI w granicach normy [4, 10]. Aspekt prawidłowej oceny własnej sylwetki wykazuje także związek z atrakcyjnością seksualną. Samoocena jest uważana za narzędzie wypracowane ewolucyjnie, które służyć ma kontroli relacji interpersonalnych. Osoby o właściwej ocenie swojego ciała są przez partnerów seksualnych postrzegane jako bardziej atrakcyjne, co silniej obserwuje się u kobiet, niż u mężczyzn [2].

Przekrojowe badania wykazują, iż 66% kobiet z obszaru USA nie jest zadowolonych ze swojej masy ciała. Niektóre z nich podają, iż stosują dietę redukcyjną, mimo iż ich masa ciała jest prawidłowa [5]. Według badań na populacji meksykańskiej 40% kobiet nieprawidłowo ocenia swoją masę ciała, przy czym połowa z nich ją zawyża, zaś połowa zaniża [14]. Większość prac z tego zakresu skupia się jednak na osobach w wieku dojrzewania lub cierpiących na pewne schorzenia (otyłość, anoreksja, bulimia, depresja etc.). Obecny stan wiedzy wykazuje lukę w kwestii zjawiska nieprawidłowej estymacji masy ciała w populacji ogólnej o zróżnicowanym wieku i statusie społecznym. Jednocześnie warty poruszenia jest aspekt tego czy zaburzenie oceny masy ciała jest problemem, który kobiety odnoszą wyłącznie do samej siebie czy też związane jest ono z ogólnym brakiem umiejętności estymacji, którego podstawy nie są psychologiczne i wynikać mogą z przyczyn percepcyjnych. Zaobserwowanie takiej zależności wykazałoby, że należy zwrócić uwagę na biologiczne podłożę zjawiska. Odpowiedź na to pytanie otwiera możliwość dalszych badań nad przyczynami, których odkrycie umożliwiłoby dobranie najlepszej formy prewencji.

3. Koncepcja i plan badań ■

Planowane badania przeprowadzone zostaną na populacji kobiet z obszaru Polski w wieku od 20 do 79 lat, o zróżnicowanym statusie społecznym oraz miejscu zamieszkania. Dobór grupy przeprowadzony będzie losowo. Przebadanych zostanie 10 000 kobiet. Całość trwania projektu planowana jest na trzy lata, z czego na prowadzenie badań przeznaczone zostaną dwa pierwsze lata. Ostatni rok trwania projektu poświęcony będzie na analizę uzyskanych wyników, pisanie publikacji oraz konferencje naukowe, na których przedstawione zostaną uzyskane rezultaty.

Badane kobiety zostaną poproszone o wypełnienie kwestionariusza, który zbierać będzie podstawowe informacje dotyczące wieku, statusu społecznego oraz miejsca zamieszkania. Prócz tego, za pomocą powyższej ankiety, zebrany zostanie wywiad na temat czynników zdrowotnych oraz fizjologicznych, które wywierają wpływ na zmiany masy ciała. W związku z tym badane zostaną poproszone o podanie informacji na temat przebytych ciąż, zaobserwowanych wahań masy ciała na przestrzeni ostatnich trzech miesięcy, obecności chorób przewlekłych, przyjmowanych leków, antykoncepcji hormonalnej diety oraz poziomu aktywności fizycznej. Wspomniane czynniki zdrowotne i fizjologiczne zostaną zebrane jako przyczynek do kolejnych badań, rozszerzających poruszoną tematykę.

Druga część kwestionariusza poświęcona będzie estymacji masy ciała. W przypadku własnej masy ciała badane będą raportować kiedy ostatnio się ważyły oraz ile kilogramów wynosi według nich w tym momencie ich własna masa ciała. Kolejnym krokiem będzie ocena czy badane uważają, że ich masa ciała jest prawidłowa, zbyt wysoka czy też zbyt niska; podanie optymalnej masy ciała, która według badanych jest dla nich prawidłowa oraz informacja czy są one zadowolone ze swojej masy ciała.

Następnie badane dokonają estymacji masy ciała innych osób. W tym celu wykorzystany zostanie projektor, na którym wyświetlonych będzie piętnaście wizerunków ciała kobiet zróżnicowanych pod względem wskaźnika BMI oraz pięciu typów sylwetki. Wizerunki będą wyświetlane kolejno, zaś zadaniem badanej będzie określenie czy kobieta na fotografii ma prawidłową, zbyt niską czy zbyt wysoką masę ciała.

Ostatnim krokiem procedury badawczej będzie określenie masy ciała, procentowej zawartości tkanki tłuszczowej w organizmie oraz typu sylwetki każdej z badanych. W tym celu zostaną one zważone oraz poddane pomiarom antropometrycznym. Zmierzona zostanie wysokość ciała, cięciwy barkowa, biodrowa i obwód pasa. Powyższe pomiary posłużą do wyznaczenia trzech wskaźników: BMI (Body Mass Index), WHR (Waist to Hip Ratio), WHtR (Waist to Height Ratio). Za pomocą BMI określone będzie występowanie nieprawidłowej masy ciała. BMI poniżej 18,5 zakwalifikowano jako niedowagę, w zakresie 18,5-25 oznacza prawidłową masę ciała, zaś >25 oznacza nadwagę oraz otyłość. Wskaźniki WHR, WHtR oraz pomiary cięciw posłużą do wyznaczenia pięciu typów sylwetki, które przypisane zostaną badanym:

Typ nr 1. - różnica pomiędzy cięciwą barkową, a biodrową mniejsza niż 3 cm, WHR poniżej 0,75,

Typ nr 2. - cięciwa biodrowa dłuższa od barkowej o więcej niż 3 cm,

Typ nr 3. - cięciwa barkowa dłuższa od biodrowej o więcej niż 3 cm,

Typ nr 4. - różnica pomiędzy cięciwą barkową, a biodrową mniejsza niż 3 cm, WHR powyżej 0,75,

Typ nr 5. - różnica pomiędzy cięciwą barkową, a biodrową mniejsza niż 3 cm, WHR powyżej 0,8, WHtR powyżej 0,5.

Po uzyskaniu wyników za pomocą metod statystycznych przetestowanych zostanie pięć hipotez badawczych.

4. Metodyka badań ■

W powyższym projekcie zbieranie danych zostanie przeprowadzone na terenie całej Polski przez trzyosobowy zespół badawczy. W związku z tym w trakcie dwóch pierwszych lat zrealizowanych zostanie sto dwudniowych wyjazdów. Zbadane zostaną ochotniczki, zrekrutowane poprzez ogłoszenie o projekcie umieszczone na stronach internetowych oraz w miejscach spotkań lokalnej społeczności (domy kultury, uniwersytety, koła gospodyń wiejskich etc.). Zastosowana zostanie metoda anonimowego, pisemnego kwestionariusza oraz klasyczne pomiary antropometryczne.

Na podstawie informacji zebranych w części ankietowej badane zostaną podzielone na klasy pod względem poszczególnych czynników. Wyróżnionych zostanie sześć klas wiekowych w rozstrzale co dziesięć lat. Cztery klasy w zależności od miejsca zamieszkania: wieś, miasto do 100 tys mieszkańców, od 100-300 tys oraz powyżej 300 tysięcy. Na określenie statusu społeczno-ekonomicznego złożą się takie informacje jak: wykształcenie, wykształcenie ojca i matki, roczny dochód oraz liczba rodzeństwa.

W części ankiety, w której badane będą oceniać własną masę ciała, odpowiedzą one na pięć pytań:

- Kiedy ostatnio się ważyłaś?
- Jaka jest twoja aktualna masa ciała?
- Czy twoja masa ciała jest: a) prawidłowa, b) zbyt niska, c) zbyt wysoka.
- Jaka jest twoja idealna masa ciała?
- Czy jesteś zadowolona ze swojej aktualnej masy ciała?

Kolejnym elementem badania będzie estymacja masy ciała innych kobiet na podstawie wizerunków wyświetlanych za pomocą projektora multimedialnego. W celu stworzenia wzorca wspomnianych wizerunków dobrana zostanie grupa 15 kobiet. Będą one podzielone na trzy podgrupy po pięć osób, różniące się między sobą wskaźnikiem BMI. Grupa niedowagi: BMI 17+/-0,5, grupa normy: BMI 22+/-0,5, grupa nadwagi: BMI 27+/-0,5. W obrębie tych trzech z grup każda z kobiet będzie reprezentatywna dla jednego z pięciu typów sylwetki, wyróżnionych w tym badaniu. Dobrane w ten sposób – na podstawie pomiarów – modelki zostaną sfotografowane na białym tle w pozycji frankfurckiej en face oraz z perspektywy bocznej. Do wykonania zdjęć zostaną one ubrane w obcisłą odzież w kolorze czarnym, zakrywającą całą powierzchnię ciała. Ma to na celu lepszy kontrast sylwetki na białym tle oraz eliminację wpływu innych składowych wyglądu modelki na estymację jej masy ciała. Wykonane zdjęcia zostaną poddane postprodukcji graficznej, podczas której zakryta zostanie twarz. Zdjęciom, w losowej kolejności, zostaną przypisane numery od 1 do 15. Podczas badania będą one wyświetlane kolejno na slajdach: na każdym z nich będą znajdować się dwa zdjęcia jednej modelki ujętej en face oraz z perspektywy bocznej. Zadaniem badanych będzie dopasowanie do wyświetlanej fotografii jednej z trzech kategorii: niedowaga, prawidłowa masa ciała lub nadwaga. Po wyświetleniu każdego ze slajdów badana będzie miała za zadanie zaznaczenie swojej estymacji na formularzu kwestionariusza. Badane nie zostaną poinformowane o tym, że modelki, których zdjęcia oglądają, różnią się pomiędzy sobą pod względem typu sylwetki. Będzie to miało na celu wykazanie czy konkretny typ sylwetki jest w stanie wpłynąć na ocenę masy ciała.

Podczas pomiarów antropometrycznych, które nastąpią po wypełnieniu kwestionariusza wykonane zostaną następujące procedury. Badane zostaną zważone oraz określona zostanie procentowa zawartość tkanki tłuszczowej w ich organizmie za pomocą analizatora składu ciała Jawon Medical 101-353. Następnie przy pomocy antropometru zmierzona zostanie wysokość ciała. Obwód pasa wyznaczony zostanie dzięki pomiarowi taśmą antropometryczną, zaś cięciwy będą zmierzone cyrklem kabłąkowym dużym. W ten sposób uzyskane pomiary (wysokość ciała, obwód pasa, cięciwa barkowa, cięciwa biodrowa) posłużą do obliczenia wskaźników BMI, WHR oraz WhtR.

Hipotezy badawcze zostaną przetestowane statystycznie za pomocą programu Statistica 12. W badaniach przyjęty zostanie poziom istotności $p < 0,05$. W przypadku danych ciągłych istotność różnic pomiędzy grupami można określić za pomocą analizy wariancji. W przypadku zmiennych kategoriycznych za pomocą testu χ^2 .

Po uzyskaniu wyników oraz zakończeniu analizy danych zespół badawczy przystąpi do przygotowania ich prezentacji. Efekty powyższych badań planowo zostaną przedstawione podczas dwóch konferencji międzynarodowych. Z uzyskanych wyników przygotowane zostaną dwie publikacje. Zamiarem zespołu badawczego będzie opublikowanie efektów projektu w czasopiśmie *Proceedings of the Royal Society B. Biological sciences* ze względu na to, iż powyższe badania stanowią rozwinięcie oraz ukazują w szerszym kontekście tematykę poruszoną w artykule *The estimation of body mass index and physical attractiveness is dependent on the observer's own body mass index*.

5. Literatura ■

1. 2015. *Ten Facts on Obesity*. WHO Fact Sheet Number 311.
2. Bale C, Archer J. 2013. *Self-perceived attractiveness, romantic desirability and self-esteem: a mating sociometer perspective*. *Evol Psychol.*, 11(1): 68-84.
3. Collier D. A., Arranz M. J., Li T., Dennis M., Brown N., Treasure J. 1997. *Association between 5-HT2A gene promoter polymorphism and anorexia nervosa*. *The Lancet* 350 (9): 412.
4. Elavsky S. 2010. *Longitudinal examination of the exercise and self-esteem model in middle-aged women*. *J Sport Exerc Psychol.*, 32(6): 862-80.
5. Friedman K. E., Reichmann S. K., Costanzo P. R., Musante G.J. 2002. *Body image partially mediates the relationship between obesity and psychological distress*. *Obes Res*, 10: 33-41.
6. Garner D.M. 1997. *The body image survey results*. *Psychol Today.*, 30: 75-84.
7. Holland A. J., Sicotte N., Treasure, J. 1988. *Anorexia nervosa: evidence for a genetic basis*. *Journal of Psychosom Res*, 32: 561-571.
8. Horm J., Anderson K. 1993. *Who in America is trying to lose weight?* *Ann Intern Med.*, 119:672-6.

9. **Kendrin R. Sonnevile, Jerel P. Calzo, Nicholas J. Horton, Jess Haines, S. Bryn Austin, Alison E. Field. 2012.** *Body Satisfaction, Weight Gain, and Binge Eating Among Overweight Adolescent Girls.* *Int J Obes (Lond)*, 36(7): 944–949.
10. **Martin J. Tové e, Joanne L. Emery, Esther M. Cohen–Tovée. 2000.** *The estimation of body mass index and physical attractiveness is dependent on the observer's own body mass index.* *Proceedings of the royal society B. Biological sciences*, 267, 1456.
11. **Ozmen D., Ozmen E., Ergin D., Cetinkaya A.C., Sen N., Dundar P.E., Taskin O. 2007.** *The association of self-esteem, depression and body satisfaction with obesity among Turkish adolescents.* *BMC Public Health*, 7: 80.
12. **Price M.E., Pound N., Dunn J., Hopkins S., Kang J. 2013.** *Body Shape Preferences: Associations with Rater Body Shape and Sociosexuality.* *PLoS ONE* 8 (1).
13. **Rodin J., Silberstein L., Striegel-Moore R. 1985.** *Women and weight: a normative discontent.* *Psychology and Gender: Nebraska Symposium on Motivation.*, 32: 267–307.
14. **Sámáno R., Rodríguez-Ventura A. L., Sánchez-Jiménez B., Godínez Martínez J.Y, Noriega A., Zelonka R., Garza M., Nieto J. 2015.** *Satisfacción de la imagen corporal en adolescentes y adultos mexicanos y su relación con la autopercepción corporal y el índice de masa corporal real.* *Nutr Hosp.*, 31(3): 1082-1088

Kosztozys ■

Pozycja	Koszty w poszczególnych latach (zł)			Razem
	2018	2019	2020	
1. Koszty bezpośrednie, w tym:	130799	114000	79000	323799
1/ Wynagrodzenia	54000	54000	54000	162000
2/ Aparatura	16799	0	0	16799
3/ Inne koszty bezpośrednie	60000	60000	25000	145000
2. Koszty pośrednie	22800	22800	15800	61400
Suma kosztów (1+2)	153599	136800	94800	385199

Uzasadnienie kosztów ■

Koszty wynagrodzeń obejmują wypłaty 1500 zł miesięcznie dla trzech osób przez okres trzech lat: $1500 \times 3 \times 12 \times 3 = 162000$.

Aparatura obejmuje koszt zakupu Wieloczęstotliwościowego Składanego Analizatora Segmentowej Analizy Składu Ciała Człowieka JAWON MEDICAL IOI 353 z wbudowaną wagą i drukarką termiczną oraz oprogramowanie BodyPass: 16799 zł.

Koszty sprzętu są stosunkowo niewielkie ze względu na wykorzystanie narzędzi antropometrycznych dostępnych w Zakładzie Antropologii Instytutu Zoologii Uniwersytetu Jagiellońskiego.

Inne koszty bezpośrednie obejmują koszt:

- zaplanowanych na dwa lata stu wyjazdów terenowych w celu zgromadzenia danych (diety dojazdowe i pobytowe dla 3 osób) – $100 \times 400 \times 3 = 120000$ zł.
- wyjazdu na dwie konferencje zagraniczne - koszt wyjazdu trzech osób na jedną konferencję wyniesie 5000 zł.
- publikacja wyników badań w systemie Open Acces oraz korekta językowa – 10000 zł.

RECENZJE ■

prof. dr hab. Ryszard Korona:

Mocne strony wniosku

Taka tematyka może wzbudzać duże zainteresowanie poza kręgami ściśle naukowymi. Tym samym, może mieć istotne znaczenie dla popularyzacji nauki. Wniosek wydaje się być stosunkowo dobrze oparty na literaturze przedmiotem. Problem oceny własnej sylwetki i jej atrakcyjności może być ważny dla wielu ludzi, nie tylko kobiet, badania tego typu mogą okazać się dla nich pomocne.

Słabe strony wniosku

Nie jestem pewien nowatorstwa projektu. Powtórzenie badań zrobionych gdzieś indziej na populacji polskiej nie jest samo w sobie nowatorstwem. Nie jestem antropologiem czy socjobiologiem ludzkim. Być może są tu istotne elementy nowatorstwa, ale nie zostało to zaznaczone w tekście.

Wśród pięciu głównych hipotez, trzy pierwsze nie są właściwie hipotezami ale ogólnikowymi zdaniem, które zawsze okażą się częściowo prawdziwe a częściowo nieprawdziwe.

Widzę podstawową sprzeczność w doborze próby badawczej. Raz czytamy: „Planowane badania przeprowadzone zostaną na populacji kobiet z obszaru Polski w wieku od 20 do 79 lat, o zróżnicowanym statusie społecznym oraz miejscu zamieszkania. Dobór grupy przeprowadzony będzie losowo.” A potem: „Zbadane zostaną ochotniczki, zrekrutowane poprzez ogłoszenie o projekcie umieszczone na stronach internetowych oraz w miejscach spotkań lokalnej społeczności (domy kultury, uniwersytety, koła gospodyń wiejskich etc.)” czyli nie będzie doboru losowego, próba może być bardzo wybiórcza. W szczególności, kobiety mniej zadowolone z własnej figury odmówią udziału w badaniach.

Zamierzenia są chyba nierealne. W sumie 10000 kobiet. Czyli po 100 w stu dwudniowych wycieczkach. Każda nie tylko ankietowana, ale i mierzona, i poddana badaniom postrzegania. Ja sobie tego nie wyobrażam. Trzeba by rozdawać atrakcyjne gadżety. Ale żelazka lub kolorowe skarpetki przyciągną radykalnie różne grupy i wpłyną na dobór próby.

Testy statystyczne nie zostały zaplanowane. W pakiecie Statistica jest ich wiele. Czy celem jest badanie predyktorów czy badanie korelacyjne. Poziom istotności 0.05 dla każdej szczegółowej hipotezy? Trzeba zaplanować poprawki na wielokrotność porównań. Jeśli rzeczywiście uda się zgromadzić dane od tysięcy kobiet to, przy tak wielkiej próbie, pojawi się wiele słabych sygnałów statystycznych i dlatego trzeba dokładnie zaplanować całość analiz ■

Anna Gądek:

Ocena merytoryczna projektu

Uważam, że badania mające na celu zweryfikowanie zależności pomiędzy wybranymi czynnikami, a oceną własnej masy ciała oraz innych kobiet są bardzo interesujące. Ciekawym pomysłem jest wyznaczenie poszczególnych typów sylwetki. Moim zdaniem projekt zawiera elementy nowatorskie zważywszy na lukę w obecnym stanie wiedzy dotyczącą kwestii zjawiska nieprawidłowej estymacji masy ciała w populacji ogólnej o zróżnicowanym wieku i statusie społecznym. Ponadto projekt ma charakter naukowy, spełnia kryterium badań podstawowych oraz uwzględnia wszystkie wymagane części. Temat zaś przedstawiony został zrozumiale i logicznie.

Pierwszą publikację zaplanowano po upływie dwóch lat, gdy badania zostaną już zakończone. Sugerowałabym jednak wprowadzenie podziału grupy badanych kobiet (przykładowo w pierwszym roku przebadanie kobiet mieszkających w mieście, a w kolejnym mieszkających na wsi). Pozwoliłoby to na otrzymanie kompletu badań dla jednej grupy już po upływie roku.

Ocena kosztorysu

Kosztorys przygotowano starannie ze szczegółowym uzasadnieniem planowanych wydatków. Biorąc pod uwagę, że badania będą prowadzone na terenie całego kraju, a przebadanych zostanie 10 000 kobiet, sugerowałabym zaplanowanie wyjazdów w bardziej odległej części Polski na dłużej niż dwa dni.

Ocena możliwości wykonania

Moim zdaniem istnieje bardzo duża możliwość wykonania projektu. Metodyka została starannie opracowana. Uważam, że rekrutowanie ochotniczek do przystąpienia do projektu nie będzie stanowiło problemu, a uzyskanie danych istotnych statystycznie pozwoli sprawdzić czy występuje zależność pomiędzy wybranymi czynnikami, a oceną masy ciała własnej oraz innych kobiet.

Mocne strony wniosku:

- szczegółowo dopracowana metodyka,
- sprecyzowanie docelowych czasopism, do których kierowane będą publikacje,
- projekt zawiera elementy nowatorskie ;

Słabe strony wniosku:

- długi czas trwania badań (zaplanowanie pierwszej publikacji dopiero po dwóch latach) ■

Krzysztof Miler:

Autorki podejmują w projekcie kwestię oceny masy ciała u kobiet. W centrum znajduje się hipoteza, że trafność samooceny masy ma związek z tym, jak postrzegana jest masa ciała innych kobiet w populacji. Proponowane badania mają charakter interdyscyplinarny, znajdują się na pograniczu antropologii, psychologii, biologii i zdrowia publicznego, co dobrze mu wróży.

Projekt wygląda jednak na niedokończony, jest też w nim sporo niespójności, wobec tego aby uznać go za akceptowalny musi być w nim wprowadzonych szereg zmian. Moje sugestie i obawy dotyczą tego, że:

- Prócz przetestowania głównej hipotezy, autorki chcą też wskazać czynniki, które wpływają na postrzeganie masy ciała (własnej i innych) w kontekście prewencji zaburzeń odżywiania (te mogą wynikać z zaburzonego postrzegania własnej masy). Nie wiadomo jednak, jaki jest cel badania znaczenia tych czynników dla postrzegania masy ciała innych (co nie ma nic wspólnego z prewencją). Na przykład, jeśli kobiety w pewnym wieku są bardziej skłonne do zaburzeń postrzegania swojej masy ciała to aspekt prewencyjny jest jasny. Po co nam jednak informacja o tym, że kobiety w pewnym wieku są bardziej skłonne do zaburzeń postrzegania masy innych? To nie ma związku z przedstawionym projektem.
- Projekt ma wyraźny rys aplikacyjny (prewencja zaburzeń odżywiania) i jest w nim o tym mowa. Żaden program prewencyjny nie jest jednak zaproponowany. Należy albo go zaproponować, albo zrezygnować z podkreślenia aspektu prewencyjnego. To drugie oznacza rezygnację z badania czynników wpływających na postrzeganie masy ciała, a więc testowanie samej tylko głównej hipotezy. Biorąc pod uwagę wymóg podstawowego charakteru badań, sugerowałabym to drugie.
- Pomysł, że trafność oceny masy ciała jest niezależna od kontekstu (ja/nie-ja) jest ciekawy, ale dlaczego miałoby tak być? Brakuje w projekcie uzasadnienia, co dyskwalifikuje go na wstępie.
- W części dotyczącej celu badań kompletnie brakuje wstępnego zarysowania problemu, co sprawia że czytelnik musi się wielu rzeczy domyślać. Rozpisane hipotezy szczegółowe są zdecydowanie zbyt mało precyzyjne (na przykład, „pewna grupa kobiet” w hipotezie pierwszej czy „różne typy sylwetki” w hipotezie piątej).
- Plan badań i metodyka rozpisane są w sposób, który uniemożliwia jasne zrozumienie jakie dane wykorzystywane są do testowania czego i jak – czytelnik znów musi się wielu rzeczy domyślać. Motywacja do zbierania niektórych typów danych jest niejasna.
- W tekście widocznych jest też wiele fragmentów wymagających korekty (głównie uszczegółowienia). Mam tu na myśli na przykład wzmianki o atrakcyjności czy niezadowoleniu z masy ciała (bez związku z proponowanym projektem, a więc do usunięcia) czy enigmatyczne

fragmenty o mechanizmie (podstawa „psychologiczna” lub „percepcyjna” efektu).

Odniesienie się do proponowanych zmian spowoduje, że projekt będzie wyglądał diametralnie inaczej (łącznie z kosztorysem), dlatego nie będę rozpisywałam uwag szczegółowych. Przy poprawianiu propozycji badań warto wziąć pod uwagę zmianę tytułu – widać tu potencjał na coś chwytliwego ■

Monika Prus:

Ocena merytoryczna projektu

Projekt zakłada zajęcie się tematyką postrzegania masy ciała innych kobiet przez pryzmat tego, jak postrzegają one siebie. Wydaje się to być ciekawym podejściem do tematu, którego interdyscyplinarny charakter pozwoli wykorzystać otrzymane wyniki zarówno antropologom fizycznym, jak i psychologom. Uważam, że plan działania jest jak najbardziej poprawny.

Postawione pytania badawcze są ciekawe, aczkolwiek ostatnie wymaga przeformułowania – dla mnie jest to niezrozumiałe. Dodatkowo mam problem z celem projektu. Autorki piszą, że jest nim sprawdzenie czy istnieje zależność pomiędzy oceną własnej masy ciała i postrzeganiem masy ciała u kobiet, a wybranymi czynnikami. Co to są za czynniki? Autorki powinny mieć na tym etapie sprecyzowane o jakie czynniki chodzi. Jaka zależność? Podobny rodzaj błędu można znaleźć w hipotezie 1, gdzie czytamy, że „U pewnej grupy kobiet istnieje zależność pomiędzy oceną własnej masy ciała, a estymacją masy ciała u innych kobiet.”. Autorki powinny sprecyzować tutaj, która to grupa kobiet, bo samo wnioskowanie, że u pewnej grupy taka zależność istnieje, a u pewnej grupy jest trochę niewystarczające. Hipotezy 2 i 3 są zbyt ogólne. Nie wiemy jaka ocena – poprawna czy niepoprawna danej sylwetki jest związana z poprawnym/niepoprawnym estymowaniem masy ciała innych. Poza tym fragment drugiej hipotezy „u innych może świadczyć o niewłaściwej percepcji tego aspektu” powinien być pozbawiony wyrazu „może” – hipoteza powinna być konkretna i falsyfikowalna, a gdy coś tylko „może świadczyć” to taka nie jest.

Jeśli chodzi o zastosowaną metodykę podoba mi się fakt wzięcia pod uwagę, że analiza typów sylwetek bez zamazanych twarzy mogłaby być obciążona błędem i zdecydowanie się na usunięcie twarzy. Uważam jednak, że lepszym rozwiązaniem byłoby zastosowanie identycznych twarzy kompozytowych na wszystkich fotografiach. Dodatkowo warto, aby zdjęcia każdej z sylwetek pokazać kobiecie kilkakrotnie w różnej kolejności. Jej ocena będzie uzależniona od tego, jakie typy sylwetki już oceniała. Użycie ankiet wydaje mi się rozwiązaniem niepozbawionym wad, jednak mam nadzieję, że Autorki będą w stanie kontrolować błędy mogące wyniknąć z nierzetelnego podejścia do wypełnienia kwestionariusza przez uczestniczki. Uważam również, że wyświetlanie zdjęć przedstawiających sylwetki kobiet poprzez projektor wpłynie na gorszą widoczność/zniekształcenie zdjęć, niż gdyby byłyby one przedstawione w formie fotografii.

Ocena kosztorysu

Kosztorys jest w miarę przejrzysty, jednakże kwota innych kosztów bezpośrednich w nim zamieszczona jest o 5 000 tysięcy wyższa niż wynika to z uzasadnienia kosztów. Ponadto autorki projektu planują badanie ankietowe na 10 000 tysiącach uczestniczek, a to wiąże się z koniecznością ich wydruku, natomiast koszty zakupu podstawowych materiałów biurowych takich jak papier czy tusz nie są uwzględnione w planowanych kosztach. Dodatkowo uważam, że koszty delegacji są przeszacowane. Ostatnią rzeczą jest zaplanowanie wyjazdu na taką samą konferencję dla wszystkich 3 osób. Nie widzę uzasadnienia w tym, aby wszyscy wykonawcy jechali na tą samą konferencję.

Ocena możliwości wykonania

Uważam, że badania są realizowalne. Okres dwóch lat przeznaczony na zbieranie pomiarów wydaje mi się czasem odpowiednim, ze względu na dużą liczbę uczestniczek. Podobnie jak liczba wyjazdów.

Mocne strony

- interesujące podejście do tematu;

Słabe strony

- nieścisłości w kosztorysie,
- nieprecyzyjne hipotezy i szczegółowe cele badawcze,
- użycie projektora do wyświetlania zdjęć ocenianych sylwetek,
- drobne literówki, poza tym zastąpiłabym słowo „rozstrzale” na „przedziale” ■

Daniel Stec:

Tematyka projektu ogólnie związana jest estymacją masy ciała człowieka. Mówiąc dokładniej autorki chcą zbadać „czy istnieje zależność pomiędzy oceną własnej masy ciała i postrzeganiem masy ciała u kobiet, a wybranymi czynnikami”. Wyniki projektu mają mieć szerokie znaczenie dla zdrowia człowieka, ponieważ niewłaściwa ocena własnej masy ciała może prowadzić do zaburzeń w odżywianiu oraz otyłości. Realizacja projektu byłaby niejako dołożeniem kolejnej cegiełki do pomocy w opracowaniu najlepszej formy prewencji we wspomnianych zaburzeniach. Niemniej jednak, autorki nie sprecyzowały wystarczająco, jaki jest oczekiwany wpływ ich badań na rozwój nauki, cywilizacji i społeczeństwa. Badania w projekcie polegać mają na przeprowadzaniu ankiet z kobietami oraz na wykołowywaniu pomiarów ich ciał. Pomimo stosunkowo ciekawej tematyki, która mogłaby przykuć uwagę mediów, przedstawiony projekt zwiera kilka niejasności. Powinny one zostać przemyślane i wyjaśnione przez autorki. Moje uwagi i komentarze wylistowałem poniżej.

- Jeśli chodzi o streszczenie to nie znalazłem w nim fragmentu, który traktowałby dokładnie o spodziewanych efektach na rozwój nauki, cywilizacji i społeczeństwa.
- Sformułowanie w celu badawczym „wybrane czynniki” niewiele mówi czytającemu wniosek. Myślę, że jest zbyt ogólne, a wspomniane czynniki mogą być bardzo różne.
- W pierwszej postawionej hipotezie badawczej sformułowanie „u pewniej grupy kobiet” jest nieprecyzyjne.
- Niepoważne wydaje się być przeznaczenie 3 roku trwania projektu na analizę wyników i pisanie dwóch publikacji oraz wyjazdy konferencyjne przez wszystkie trzy autorki. Jeśli rzeczywiście analiza tych danych i przygotowanie manuskryptów są tak czasochłonne to powinno to zostać lepiej wyjaśnione w projekcie.
- Autorki projektu nie tłumaczą, dlaczego chcą użyć projektora multimedialnego a nie np. albumu, aby zbadać jak kobiety oceniają masę ciała innych kobiet na postawie ich wizerunku.
- Niezrozumiałym jest, dlaczego autorki chcą opublikować wyniki swoich badań w jednym czasopiśmie tylko i wyłącznie z tego powodu, aby polemizować z opublikowanym tam wcześniej artykułem. A co jeśli wyniki nadawać się będą do publikacji w lepszym czasopiśmie? Aby polemizować z jakimś artykułem nie ma potrzeby prowadzenia tej polemiki na łamach jednego czasopisma.
- Autorki na skrócony opis projektu mogły przeznaczyć maksymalnie 5 stron. Powyżej wymieniłem kilka kwestii, które mogłyby być przedstawione szerzej i dokładniej wyjaśnione. Brak tego wyjaśnienia nie mógłby być tłumaczonym brakiem miejsca, ponieważ formatowanie literatury może zostać zmienione, co pozwoliłoby na sprecyzowanie i wyjaśnienie wspomnianych kwestii.
- Przedstawiony w projekcie kosztorys jest moim zdaniem niedoszacowany z dwóch powodów. Autorki nie uwzględniły w nim kosztów papieru i tuszu do drukarki, spinaczy, zszywaczy, teczek, drukarki, długopisów etc. Pomijając fakt na zapotrzebowanie na wyposażenie swoich biur w materiały biurowe, to większość z nich jest także materiałem zużywalnym w projekcie. Należy pamiętać, że w projekcie planowane jest przeprowadzenie 10 000 ankiet oraz wykonanie pomiarów takiej samej liczby osób. Drugim punktem, w którym kosztorys jest niedoszacowany są konferencje zagraniczne. Koszt wyjazdu na jedną konferencję zagraniczną trzech osób jest raczej większy jak 5 000 PLN. Poza tym autorki za każdym razem planują jeździć razem na każdą z planowanych konferencji, co wydaje się być zbyt duże ■

Ocena merytoryczna projektu

Projekt zwraca uwagę na problem zaburzenia estymacji własnej masy ciała przez kobiety. Autorki sugerują, że zjawisko to może nie tylko przekładać się na błędną ocenę masy ciała u innych kobiet, ale także na ogólny brak umiejętności estymacji, którego podstawy wynikać mogą z przyczyn percepcyjnych.

Projekt został przygotowany rzetelnie i starannie. W jego tytule wkraść się jednak drobny błąd wymagający korekty: „Czynniki wpływające na ocenę...”. Projekt spełnia założenie badań podstawowych oraz ma charakter naukowy. Stanowi on także uzupełnienie luki w dotychczasowym stanie wiedzy dotyczącej estymacji masy ciała przez kobiety o zróżnicowanym wieku i statusie społecznym.

Autorki za główny naukowy cel projektu podają „sprawdzenie czy istnieje zależność pomiędzy oceną własnej masy ciała i postrzeganiem masy ciała u kobiet, a wybranymi czynnikami”. Początkowo nie podają jednak jakie czynniki brane będą pod uwagę. Uważam, że sprecyzowanie czynników w obrębie głównego celu projektu skutkowałooby jego doprecyzowaniem.

Planowane badania będą obejmowały trzy etapy – każda kobieta będzie najpierw wypełniała anonimowy kwestionariusz, następnie oceniała wagę ciała innych kobiet, po czym sama zostanie poddana pomiarom antropometrycznym. Wątpliwość budzi tutaj anonimowość kwestionariusza, ponieważ autorki nie opisały w jak sposób będą identyfikować informację otrzymane od poszczególnych badanych po wykonaniu wszystkich etapów zbioru danych. Same opisy planowanych badań zostały przygotowane szczegółowo i wydają się być wystarczające do weryfikacji postawionych hipotez i przewidywań.

W projekcie planowane są dwie publikacje naukowe w systemie Open Access oraz wystąpienia konferencyjne. Z uwagi na interesujące dla szerokiego grona odbiorców wyniki, przygotowane manuskrypty mają szansę na publikację w czasopiśmie z listy Journal Citation Reports. W związku z tym, poziom naukowy badań można uznać za bardzo dobry.

Prezentowane badania wydają się być ważne z uwagi na to, że jak zaznaczają autorki, błędna ocena własnej masy ciała może prowadzić zarówno do zaburzeń odżywiania, jak i otyłości. Warto zaznaczyć, że wyniki uzyskane po zakończeniu projektu mogą stanowić punkt wyjścia do dalszych badań i przyczynić się do poprawy diagnostyki i leczenia chorób cywilizacyjnych związanych z zaburzeniami wagi ciała.

Ocena kosztorysu

Wydatki opisane w kosztorysie zostały dość dobrze uzasadnione. Na jakiej podstawie określono jednak liczbę stu wyjazdów? W projekcie warto byłoby dodać informację na temat średniej liczby kobiet jaka może zostać zbadanych w czasie jednego wyjazdu. Kalkulacja wszystkich kosztów dla poszczególnych lat trwania projektu również jest poprawna.

Ocena możliwości wykonania

Plan badań prezentowany w projekcie wydaje się być możliwy do realizacji w sposób zaplanowany przez autorki. Na pierwsze dwa lata trwania projektu składa się przede wszystkim zbior danych, natomiast w roku trzecim zakładana jest ich analiza. Jedynym zagrożeniem może być termin opublikowania dwóch manuskryptów przy założeniu, że praca nad nimi rozpocznie się dopiero w trzecim roku trwania projektu. Może warto byłoby rozważyć rozłożenie w czasie analizy danych i publikacji części wyników rozpoczynając pracę nad nimi w trakcie drugiego roku projektu? Autorki zakładają liczbę stu dwudniowych wyjazdów rozłożonych na dwa lata – może udałoby się rozplanować większość wyjazdów na rok pierwszy co umożliwiłoby wcześniejszą analizę danych i publikację wyników?

Mocne strony wniosku

- temat projektu – interesujący i ważny dla rozwoju diagnostyki i leczenia chorób cywilizacyjnych związanych z zaburzeniami wagi ciała,

- projekt uzupełniający luki w obecnym stanie wiedzy,
- plan dwóch publikacji wyników w systemie Open Access w czasopiśmie naukowych i prezentacji na konferencjach;

Słabe strony wniosku

- termin analizy danych i publikacji wyników w postaci dwóch publikacji ustalony na trzeci rok trwania projektu,
- brak określenia obszaru ryzyka i zagrożeń;

Ocena ogólna projektu

Podsumowując powyższą recenzję, uważam że projekt mimo kilku mankamentów wart jest realizacji. W perspektywie, wyniki projektu z pewnością przysłużą się do udoskonalenia diagnostyki i leczenia chorób cywilizacyjnych związanych z zaburzeniami wagi ciała u kobiet, dlatego też sądzę, że zasługuje on na otrzymanie finansowania ■

Katarzyna Woch:

Streszczenie

- Streszczenie jest krótkie ale treściwe – posiada wszystkie najważniejsze informacje tj. w zarysie obrazuje aktualny stan wiedzy, wskazuje cel planowanych badań, przedstawia metodykę oraz informuje dlaczego wyniki będą ważne dla wielu dziedzin nauki (zdrowie publiczne, biologia, psychologia).

Cel naukowy

- Niektóre hipotezy badawcze postawione przez autorki są nieprecyzyjne i niewiele mówią nam o predykcjach eksperymentatorek (użycie wyrażen "pewna grupa" bądź "różne sylwetki"). Opisanie hipotez w bardziej konkretny sposób spowodowałoby, że autorki będą postrzegane jako ekspertki w danej dziedzinie, posiadające szeroką wiedzę.
- W tekście pojawia się pierwsza cytacja oznaczona przez autorki "[10,9]" co uważam za nieintuicyjne. Oznaczenie cytacji powinny odpowiadać chronologii ich pojawiania się.

Znaczenie projektu

- Tekst w szczegółowy sposób opisuje zależność między niewłaściwym postrzeganiem sylwetki a zaburzeniami odżywiania, a następnie wskazuje, że dotychczasowe badania nie uwzględniły wieku i statusu społecznego, jednakże autorki nie proponują jak te czynniki mogą wpływać na postrzeganie sylwetki.
- Propozycja rozszerzenia wiedzy pochodzącej z dotychczasowych badań o aspekt postrzegania się wzajemnie kobiet została klarownie wytłumaczona i przedstawione zostały implikacje płynące z możliwych wyników.
- Autorki nic nie wspomniały w tej części o wpływie różnych typów sylwetek - właściwie oprócz pojawienia się kwestii typów sylwetek w hipotezach (wiersz 37 i 50), ta część eksperymentu zostaje całkowicie ignorowana. Jeśli nie jest to związane z nieprzemyślaną koncepcją projektu, autorki powinny uzupełnić tekst o wytłumaczenie znaczenia typu sylwetki w ich badaniach .

Koncepcja i plan badań

- Autorki w precyzyjny sposób rozplanowały w czasie wykonanie projektu i wyszczególniły zaplanowane procedury, aczkolwiek mam wrażenie, że ta część została napisana trochę chaotycznie i niektóre informacje, które pojawiły się w tej części powinny znaleźć się w metodologii badań.

Metodyka badań

- Metody zaproponowane przez autorki zostały opisane w sposób bardzo szczegółowy i przemyślany.
- Momentami język używany przez autorki jest za bardzo kolokwialny (wiersz 152 "rozstrzał wiekowy").

- Uważam, że autorki powinny w kilku słowach opisać wskaźnik BMI, którym będą się posługiwać w badaniach, bądź też podać odniesienie do literatury, która tłumaczyłaby sposób i powód użycia akurat tego wskaźnika.
- Zaproponowany został podział badanych kobiet na cztery klasy w zależności od wielkości miejsca zamieszkania, jednak nigdzie wcześniej nie pojawia się żadne wytłumaczenie dlaczego według autorek możemy oczekiwać różnych wyników u kobiet ze wsi i większych miast. Z jednej strony rozumiem, że przy planowaniu takich badań zdobycie dodatkowych danych z ankiet nie jest ani bardzo czasochłonne, ani nie zwiększa znacząco kosztów projektu, mimo to uważam, że powinny pojawić się jakiegokolwiek predykcje na ten temat.

Kosztorys

- Autorki pomimo pracy na ankietach nie uwzględniły w budżecie kosztów papieru i drukarki.
- Nieuzasadnionym wydaje mi się wyjazd wszystkich trzech autorek na tę samą konferencję naukową.

Uwagi ogólne

Pomysł na eksperyment wydaje mi się bardzo ciekawy, jednakże cała koncepcja badań prezentuje się trochę chaotycznie. Autorki w szczegółowy sposób opisują i argumentują potrzebę przeprowadzenia zaproponowanych przez nie badań, znajdując lukę w odniesieniu tych wyników do różnych zmiennych, takich jak wiek, status społeczny, miejsce zamieszkania, nigdzie jednak nie wyjaśniają dlaczego ich zdaniem czynniki te mogą mieć znaczenie w ich badaniach. Uważam, że autorki powinny lepiej przemyśleć cel swoich badań i opisać go na tyle klarownie, że będzie on zrozumiały dla osoby trzeciej ■

FINALNA WERSJA PROJEKTU ■

CZYNNIKI WPŁYWAJĄCE NA OCENĘ WŁASNEJ MASY CIAŁA ORAZ POSTRZEGANIE MASY CIAŁA U INNYCH KOBIEC

AUTORZY:

Ewa Bobulska, Martyna Żurawiecka i Magdalena Żywicka

STRESZCZENIE PROJEKTU:

Postrzeżenie własnej masy ciała może być predyktorem skłonności do wystąpienia zaburzeń odżywiania oraz otyłości. Ponadto wykazano jego wpływ na atrakcyjność kobiet. Problem nieprawidłowej estymacji własnej masy ciała jest raportowany w publikacjach z wielu krajów całego świata. Przykładowo wśród kobiet meksykańskich, gdzie aż 40% nie ocenia jej trafnie. W USA aż 66% kobiet wprost deklaruje niezadowolenie ze swojej masy ciała. Celem badań jest sprawdzenie czy występuje zależność pomiędzy wybranymi czynnikami, a oceną masy ciała własnej oraz innych kobiet. Badania przeprowadzone zostaną na terenie Polski wśród kobiet w wieku 20-79 lat. Informacje uzyskane pochodzą z kwestionariusza oraz pomiarów wybranych cech antropometrycznych. Zostaną także wyliczone podstawowe wskaźniki dla oceny prawidłowości masy ciała i lokalizacji tkanki tłuszczowej. Projekt pozwoli zebrać wystarczającą ilość danych do ustalenia jak duży odsetek kobiet w Polsce nieprawidłowo estymuje masę ciała i czy jest to związane z błędnym postrzeganiem sylwetek innych kobiet. Hipoteza iż typ rozkładu otłuszczenia może mieć wpływ na ocenę masy ciała jak dotąd nie została przetestowana. Jest to aspekt wart poruszenia, ponieważ może wyjaśniać powszechność zjawiska błędnej estymacji. Ponadto ważnym aspektem jest zwrócenie uwagi na rolę prawidłowej oceny masy ciała w prewencji zaburzeń odżywiania oraz otyłości. Problem błędnej oceny masy ciała wpływa również negatywnie na postrzeżenie atrakcyjności kobiety. Dlatego też samoocena może wpływać pośrednio na sukces reprodukcyjny.

1. Cel naukowy projektu ■

Błędna ocena własnej masy ciała może prowadzić zarówno do zaburzeń odżywiania, jak i otyłości

[Tovée 2000, Kendrin 2012]. Celem naukowym projektu jest sprawdzenie czy istnieje zależność pomiędzy oceną własnej masy ciała i postrzeganiem masy ciała u kobiet, a wybranymi czynnikami.

Postawiono następujące pytania badawcze:

- Czy istnieje zależność pomiędzy oceną własnej masy ciała, a postrzeganiem masy ciała u innych kobiet?
- Czy wiek wpływa na ocenę własnej masy ciała i postrzeganiem masy ciała u innych kobiet?
- Czy typ sylwetki i rozkład otłuszczenia ma wpływ na estymację masy ciała?

W celu odpowiedzi na te pytania sformułowano pięć hipotez badawczych:

- Istnieje zależność pomiędzy oceną własnej masy ciała, a estymacją masy ciała u innych kobiet.
- Zależność pomiędzy oceną własnej masy ciała, a estymacją masy ciała u innych świadczy o niewłaściwej percepcji tego aspektu.
- Brak zależności pomiędzy oceną własnej masy ciała, a estymacją masy ciała u innych świadczy o psychologicznym podłożu zjawiska.
- Wiek ma wpływ na ocenę własnej masy ciała i postrzeganie masy ciała innych.
- Typ sylwetki i rozkład otłuszczenia ma wpływ na estymację masy ciała.

2. Znaczenie projektu ■

Zaburzenia odżywiania są coraz powszechniejszym zjawiskiem, z kolei otyłość stanowi jeden z głównych problemów zdrowotnych XXI wieku. Już w 1997 roku została ona uznana przez WHO za chorobę cywilizacyjną [WHO Fact Sheet 2015]. Ministerstwo Zdrowia Wielkiej Brytanii szacuje, że jeśli aktualny trend zostanie utrzymany do roku 2050 średnia długość życia ulegnie skróceniu o pięć lat [WHO Fact Sheet 2015]. Z tego względu niezwykle ważna jest prewencja rozpowszechniania się obu problemów w społeczeństwie. Niewłaściwa ocena własnej masy ciała może prowadzić do obu tych schorzeń [Kendrin 2012], co skłania do przemyślenia czy kontrola samooceny nie powinna zostać jednym z elementów programów prewencyjnych. Postuluje się, iż właściwa percepcja własnego ciała wpływa na uzyskanie oraz utrzymanie prawidłowej masy ciała [Sámano 2015]. Badania longitudinalne potwierdziły, iż kobiety w średnim wieku, które właściwie postrzegają swoje ciało częściej kontynuują wzmożoną aktywność fizyczną, dzięki czemu utrzymują BMI w granicach normy [Elavsky 2010, Tovée 2000]. Aspekt prawidłowej oceny własnej sylwetki wykazuje także związek z atrakcyjnością seksualną. Samoocena jest uważana za narzędzie wypracowane ewolucyjnie, które służyć ma kontroli relacji interpersonalnych. Osoby o właściwej ocenie swojego ciała są przez partnerów seksualnych postrzegane jako bardziej atrakcyjne, co silniej obserwuje się u kobiet, niż u mężczyzn [Bale 2013].

Przekrojowe badania wykazują, iż 66% kobiet z obszaru USA nie jest zadowolonych ze swojej masy ciała. Niektóre z nich podają, iż stosują dietę redukcyjną, mimo iż ich masa ciała jest prawidłowa [Friedman 2002]. Według badań na populacji meksykańskiej 40% kobiet nieprawidłowo ocenia swoją masę ciała, przy czym połowa z nich ją zawyża, zaś połowa zaniża [Sámano 2015]. Większość prac z tego zakresu skupia się jednak na osobach w wieku dojrzewania lub cierpiących na pewne schorzenia (otyłość, anoreksja, bulimia, depresja etc.). Obecny stan wiedzy wykazuje lukę w kwestii zjawiska nieprawidłowej estymacji masy ciała w populacji ogólnej o zróżnicowanym wieku. Brak także uwzględnienia czynnika jakim jest typ sylwetki, wynikający z somatotypu oraz rozkładu tkanki tłuszczowej. Można podejrzewać, iż nierównomierny rozkład otłuszczenia i lokalizacja większej objętości tkanki tłuszczowej w jednym obszarze ciała może mieć wpływ na ocenę prawidłowości całkowitej masy ciała. Jak dotąd czynnik ten nie przebadany, co sprawia, że powyższy projekt może położyć podwaliny pod podjęcie badań w zupełnie nowym kierunku. Jednocześnie warty poruszenia jest aspekt tego czy zaburzenie oceny masy ciała jest problemem, który kobiety odnoszą wyłącznie do samej siebie czy też związane jest ono z ogólnym brakiem umiejętności estymacji, którego podstawy nie są psychologiczne i wynikać mogą z przyczyn percepcyjnych. Jak dotąd powszechnie zakładano iż zjawisko to występuje w przypadku oceny własnej masy. Hipoteza ta jednak nie została przetestowana i brak danych literaturowych, które wyraźnie opisywałyby podstawy tego założenia. Zaobserwowanie takiej zależności wykazałoby, że należy zwrócić uwagę na biologiczne podłożo zjawiska. Odpowiedź na to pytanie otwiera możliwość dalszych badań nad przyczynami, których odkrycie

umożliwiłoby dobranie najlepszej formy prewencji.

3. Koncepcja i plan badań ■

Planowane badania przeprowadzone zostaną na populacji kobiet z obszaru Polski w wieku od 20 do 79 lat, o zróżnicowanym statusie społecznym oraz miejscu zamieszkania. Dobór grupy przeprowadzony będzie losowo. Przebadanych zostanie 10 000 kobiet. Całość trwania projektu planowana jest na trzy lata, z czego na prowadzenie badań przeznaczone zostaną dwa pierwsze lata. Ostatni rok trwania projektu poświęcony będzie na analizę uzyskanych wyników, pisanie publikacji oraz konferencje naukowe, na których przedstawione zostaną uzyskane rezultaty.

Badane kobiety zostaną poproszone o wypełnienie kwestionariusza, który zbierać będzie podstawowe informacje. Kluczową zmienną będzie wiek. Prócz tego, za pomocą powyższej ankiety, zebrany zostanie wywiad na temat czynników zdrowotnych oraz fizjologicznych, które wywierają wpływ na zmiany masy ciała. W związku z tym badane zostaną poproszone o podanie informacji na temat przebytych ciężych, zaobserwowanych wahań masy ciała na przestrzeni ostatnich trzech miesięcy, obecności chorób przewlekłych, przyjmowanych leków, antykoncepcji hormonalnej diety oraz poziomu aktywności fizycznej. Wspomniane czynniki zdrowotne i fizjologiczne pozwolą określić wielkość grupy utrzymującej zbliżoną masę ciała w trakcie ontogenezy, oraz grupy, w której dochodziło do zmian masy ciała z powodów środowiskowych lub chorobowych. Dane te mogą także posłużyć jako przyczynek do kolejnych badań, rozszerzających poruszoną tematykę.

Druga część kwestionariusza poświęcona będzie estymacji masy ciała. W przypadku własnej masy ciała badane będą raportować kiedy ostatnio się ważyły oraz ile kilogramów wynosi według nich w tym momencie ich własna masa ciała. Kolejnym krokiem będzie ocena czy badane uważają, że ich masa ciała jest prawidłowa, zbyt wysoka czy też zbyt niska; podanie optymalnej masy ciała, która według badanych jest dla nich prawidłowa oraz informacja czy są one zadowolone ze swojej masy ciała.

Następnie badane dokonają estymacji masy ciała innych osób. W tym celu wykorzystany zostanie projektor, na którym wyświetlonych będzie piętnaście wizerunków ciała kobiet zróżnicowanych pod względem wskaźnika BMI oraz pięciu typów sylwetki. Wizerunki będą wyświetlane kolejno, zaś zadaniem badanej będzie określenie czy kobieta na fotografii ma prawidłową, zbyt niską czy zbyt wysoką masę ciała.

Ostatnim krokiem procedury badawczej będzie określenie masy ciała, procentowej zawartości tkanki tłuszczowej w organizmie oraz typu sylwetki każdej z badanych. W tym celu zostaną one zważone oraz poddane pomiarom antropometrycznym. Zmierzona zostanie wysokość ciała (rozpiętość pomiędzy punktem *basion* i *vertex*), cięciwy barkowa (rozpiętość pomiędzy punktami *acromion*), biodrowa (rozpiętość pomiędzy punktami *iliospinale*), obwód pasa i obwód bioder. Powyższe pomiary posłużą do wyznaczenia trzech wskaźników: BMI (Body Mass Index) – stosunek kwadratu wysokości ciała wyrażonej w metrach do masy ciała w kilogramach, WHR (Waist to Hip Ratio) – stosunek obwodu pasa do obwodu bioder, WHtR (Waist to Height Ratio) – stosunek obwodu pasa do wysokości ciała. Za pomocą BMI określone będzie występowanie nieprawidłowej masy ciała. BMI poniżej 18,5 zakwalifikowano jako niedowagę, w zakresie 18,5-25 oznacza prawidłową masę ciała, zaś >25 oznacza nadwagę oraz otyłość. Powyższe miary zostały dobrane, by określić kolejno: prawidłową masę ciała oraz typ otyśzczenia. Dodatkowo WHR jest także stosowany jako jedna z miar atrakcyjności seksualnej. Wskaźniki WHR, WHtR oraz pomiary cięciw posłużą do wyznaczenia pięciu typów sylwetki, które przypisane zostaną badanym:

Typ nr 1. - różnica pomiędzy cięciwą barkową, a biodrową mniejsza niż 3 cm, WHR poniżej 0,75,

Typ nr 2. - cięciwa biodrowa dłuższa od barkowej o więcej niż 3 cm,

Typ nr 3. - cięciwa barkowa dłuższa od biodrowej o więcej niż 3 cm,

Typ nr 4. - różnica pomiędzy cięciwą barkową, a biodrową mniejsza niż 3 cm, WHR powyżej 0,75,

Typ nr 5. - różnica pomiędzy cięciwą barkową, a biodrową mniejsza niż 3 cm, WHR powyżej 0,8, WHtR powyżej 0,5.

Po uzyskaniu wyników za pomocą metod statystycznych przetestowanych zostanie pięć hipotez badawczych.

4. Metodyka badań ■

W powyższym projekcie zbieranie danych zostanie przeprowadzone na terenie całej Polski przez trzypięciorobowy zespół badawczy. W związku z tym w trakcie dwóch pierwszych lat zrealizowanych zostanie około stu dwudniowych wyjazdów. Długość trwania jednego wyjazdu będzie uzależniona od odległości oraz wielkości próby badawczej. Zbadane zostaną ochotniczki, zrekrutowane poprzez ogłoszenie o projekcie umieszczone na stronach internetowych oraz w miejscach spotkań lokalnej społeczności (domy kultury, uniwersytety, koła gospodyń wiejskich etc.). Dywersyfikacja miejsc, w których rozmieszczone zostaną ogłoszenia, oraz wielkość grupy pozwoli na jej randomizację. Zastosowana zostanie metoda anonimowego, pisemnego kwestionariusza oraz klasyczne pomiary antropometryczne. Anonimowość kwestionariusza zostanie zapewniona poprzez przyznanie każdej badanej unikalnego kodu numerycznego. Dzięki temu poszczególne części badania będą powiązane z jedną osobą bez konieczności podawania jej danych personalnych.

Na podstawie informacji zebranych w części ankietowej badane zostaną podzielone na klasy pod względem poszczególnych czynników. Wyróżnionych zostanie sześć klas wiekowych w rozpiętości co dziesięć lat.

W części ankiety, w której badane będą oceniać własną masę ciała, odpowiedzą one na pięć pytań:

- Kiedy ostatnio się ważyłaś?
- Jaka jest twoja aktualna masa ciała?
- Czy twoja masa ciała jest: a) prawidłowa, b) zbyt niska, c) zbyt wysoka.
- Jaka jest twoja idealna masa ciała?
- Czy jesteś zadowolona ze swojej aktualnej masy ciała?

Kolejnym elementem badania będzie estymacja masy ciała innych kobiet na podstawie wizerunków wyświetlanych za pomocą projektora multimedialnego. W celu stworzenia wzorca wspomnianych wizerunków dobrane zostanie grupa 15 kobiet. Będą one podzielone na trzy podgrupy po pięć osób, różniące się między sobą wskaźnikiem BMI. Grupa niedowagi: BMI 17+/-0,5, grupa normy: BMI 22+/-0,5, grupa nadwagi: BMI 27+/-0,5. W obrębie tych trzech z grup każda z kobiet będzie reprezentatywna dla jednego z pięciu typów sylwetki, wyróżnionych w tym badaniu. Dobrane w ten sposób – na podstawie pomiarów – modelki zostaną sfotografowane na białym tle w pozycji frankfurckiej en face oraz z perspektywy bocznej. Do wykonania zdjęć zostaną one ubrane w obcisłą odzież w kolorze czarnym, zakrywającą całą powierzchnię ciała. Ma to na celu lepszy kontrast sylwetki na białym tle oraz eliminację wpływu innych składowych wyglądu modelki na estymację jej masy ciała. Wykonane zdjęcia zostaną poddane postprodukcji graficznej, podczas której zakryta zostanie twarz. Zdjęciom, w losowej kolejności, zostaną przypisane numery. Podczas badania będą one wyświetlane kolejno na slajdach w trzykrotnym powtórzeniu i losowej kolejności: na każdym z nich będą znajdować się dwa zdjęcia jednej modelki ujętej en face oraz z perspektywy bocznej. Dzięki trzykrotnemu powtórzeniu łącznie zostanie wyświetlonych 45 slajdów z 15 fotografiami. Zadaniem badanych będzie dopasowanie do wyświetlanej fotografii jednej z trzech kategorii: niedowaga, prawidłowa masa ciała lub nadwaga. Po wyświetleniu każdego ze slajdów badana będzie miała za zadanie zaznaczenie swojej estymacji na formularzu kwestionariusza. Badane nie zostaną poinformowane o tym, że modelki, których zdjęcia oglądają, różnią się pomiędzy sobą pod względem typu sylwetki. Z tego względu także wykorzystany zostanie projektor. Umożliwi on ocenę sylwetki naturalnych rozmiarów i z właściwej perspektywy, której nie dawałby wydruk zdjęć. Jednocześnie prezentacja kolejnych fotografii wyeliminuje możliwość, iż badane będą porównywać poszczególne sylwetki między sobą. Ta część badania będzie miała na celu wykazanie czy konkretny typ sylwetki jest w stanie wpłynąć na ocenę masy ciała.

Podczas pomiarów antropometrycznych, które nastąpią po wypełnieniu kwestionariusza wykonane zostaną następujące procedury. Badane zostaną zważone oraz określona zostanie procentowa zawartość tkanki tłuszczowej w ich organizmie za pomocą analizatora składu ciała Jawon Medical 101-353. Następnie przy pomocy antropometru zmierzona zostanie wysokość ciała. Obwód pasa wyznaczony zostanie dzięki pomiarowi taśmą antropometryczną, zaś cięciwy będą zmierzone cyrklem kabłąkowym dużym. W ten sposób uzyskane pomiary (wysokość ciała, obwód pasa, cięciwa barkowa, cięciwa biodrowa) posłużą do obliczenia wskaźników BMI, WHR oraz WHtR.

Hipotezy badawcze zostaną przetestowane statystycznie za pomocą programu Statistica 12. W badaniach przyjęty zostanie poziom istotności $p < 0,05$. Cele badawcze zostaną zbadane za pomocą testu Chi-kwadrat niezależności i test V-Cramera.

Po uzyskaniu wyników oraz zakończeniu analizy danych zespół badawczy przystąpi do przygotowania ich prezentacji. Efekty powyższych badań planowo zostaną przedstawione podczas dwóch konferencji międzynarodowych. Z uzyskanych wyników przygotowane zostaną dwie publikacje. Zamiarem zespołu badawczego będzie opublikowanie efektów projektu w czasopiśmie z listy filadelfijskiej. Pojawienie się prac o tematyce zbliżonej do przedstawionej w tym projekcie w periodyku *Proceedings of the Royal Society B. Biological sciences* dowodzi, iż wyniki prac mają realną szansę na publikację w prestiżowym czasopiśmie.

5. Literatura ■

2015. *Ten Facts on Obesity*. WHO Fact Sheet Number 311.

Bale C, Archer J. 2013. *Self-perceived attractiveness, romantic desirability and self-esteem: a mating sociometer perspective*. *Evol Psychol.*, 11(1): 68-84.

Collier D. A., Arranz M. J., Li T., Dennis M., Brown N., Treasure J. 1997. *Association between 5-HT2A gene promoter polymorphism and anorexia nervosa*. *The Lancet* 350 (9): 412.

Elavsky S. 2010. *Longitudinal examination of the exercise and self-esteem model in middle-aged women*. *J Sport Exerc Psychol.*, 32(6): 862-80.

Friedman K. E., Reichmann S. K., Costanzo P. R., Musante G.J. 2002. *Body image partially mediates the relationship between obesity and psychological distress*. *Obes Res*, 10: 33-41.

Garner D.M. 1997. *The body image survey results*. *Psychol Today.*, 30: 75-84.

Holland A. J., Sicotte N., Treasure, J. 1988. *Anorexia nervosa: evidence for a genetic basis*. *Journal of Psychosom Res*, 32: 561-571.

Horm J., Anderson K. 1993. *Who in America is trying to lose weight?* *Ann Intern Med.*, 119:672-6.

Kendrin R. Sonnevile, Jerel P. Calzo, Nicholas J. Horton, Jess Haines, S. Bryn Austin, Alison E. Field. 2012. *Body Satisfaction, Weight Gain, and Binge Eating Among Overweight Adolescent Girls*. *Int J Obes (Lond)*, 36(7): 944-949.

Martin J. Tovée, Joanne L. Emery, Esther M. Cohen-Tovée. 2000. *The estimation of body mass index and physical attractiveness is dependent on the observer's own body mass index*. *Proceedings of the royal society B. Biological sciences*, 267, 1456.

Ozmen D., Ozmen E., Ergin D., Cetinkaya A.C., Sen N., Dundar P.E., Taskin O. 2007. *The association of self-esteem, depression and body satisfaction with obesity among Turkish adolescents*. *BMC Public Health*, 7: 80.

Price M.E., Pound N., Dunn J., Hopkins S., Kang J. 2013. *Body Shape Preferences: Associations with Rater Body Shape and Sociosexuality*. *PLoS ONE* 8 (1).

Rodin J., Silberstein L., Striegel-Moore R. 1985. *Women and weight: a normative discontent*. *Psychology and Gender: Nebraska Symposium on Motivation.*, 32: 267-307

Sámamo R., Rodríguez-Ventura A. L., Sánchez-Jiménez B., Godínez Martínez J.Y, Noriega A., Zelonka R., Garza M., Nieto J. 2015. *Satisfacción de la imagen corporal en adolescentes y adultos mexicanos y su relación con la autopercepción corporal y el índice de masa corporal real*. *Nutr Hosp.*, 31(3): 1082-1088

Kosztorys ■

Pozycja	Koszty w poszczególnych latach (zł)			Razem
	2018	2019	2020	
1. Koszty bezpośrednie, w tym:	135799	114000	74000	323799
1/ Wynagrodzenia	54000	54000	54000	162000
2/ Aparatura	16799	0	0	16799
3/ Inne koszty bezpośrednie	65000	60000	20000	145000
2. Koszty pośrednie	23800	22800	14800	61400

Suma kosztów (1+2)	159599	136800	88800	385199
--------------------	--------	--------	-------	--------

Uzasadnienie kosztów ■

Koszty wynagrodzeń obejmują wypłaty 1500 zł miesięcznie dla trzech osób przez okres trzech lat – $1500 \times 3 \times 12 \times 3 = 162000$.

Aparatura obejmuje koszt zakupu Wieloczęstotliwościowego Składanego Analizatora Segmentowej Analizy Składu Ciała Człowieka JAWON MEDICAL IOI 353 z wbudowaną wagą i drukarką termiczną i oprogramowanie BodyPass - 16799 zł

Koszty sprzętu są stosunkowo niewielkie ze względu na wykorzystanie narzędzi antropometrycznych dostępnych w Zakładzie Antropologii Instytutu Zoologii Uniwersytetu Jagiellońskiego.

Inne koszty bezpośrednie obejmują koszt:

- materiały biurowe (niezbędne do przeprowadzenia ankiet) – 5000 zł,
- zaplanowanych na dwa lata stu wyjazdów terenowych w celu zgromadzenia danych (diety dojazdowe i pobytowe dla 3 osób) – $100 \times 400 \times 3 = 120000$ zł,
- wyjazdu na dwie konferencje zagraniczne - koszt wyjazdu dwóch osób na jedną konferencje wyniesie 5000 zł,
- publikacja wyników badań w systemie Open Acces oraz korekta językowa – 10000 zł.

